



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCCIÓN DE XILANASAS POR CEPAS DE *Aspergillus niger* EN CULTIVO
SÓLIDO SOBRE SALVADO DE AVENA Y SALVADO DE TRIGO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Q.F.B. FEDERICO FERNÁNDEZ ISLAS

DIRIGIDO POR

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., DICIEMBRE 2012



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

PRODUCCIÓN DE XILANASAS POR CEPAS DE *Aspergillus niger* EN
CULTIVO SÓLIDO SOBRE SALVADO DE AVENA Y SALVADO DE TRIGO

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q.F.B. Federico Fernández Islas

Dirigido por:

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

SINODALES

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez
Presidente

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretario

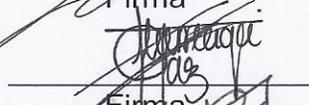
Dr. Eduardo Castaño Tostado
Vocal

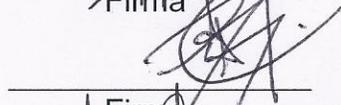
Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

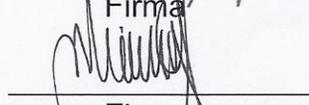
Dr. Ulises Mora Álvarez
Suplente

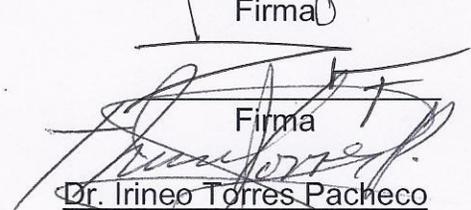
M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2012
México

RESUMEN

La producción de xilanasas de *Aspergillus* va en incremento, no obstante su producción es poco rentable debido a los elevados costos que se generan a partir cultivos que usan xilanos purificados, por lo que algunos materiales lignocelulosicos son utilizados para el crecimiento de microorganismos productores de xilanasas mediante fermentación en estado sólido. El objetivo del presente trabajo fue analizar la producción de xilanasas por cepas de *Aspergillus niger* a través de fermentación en estado sólido sobre salvado de avena y salvado de trigo. Tres cepas de *Aspergillus niger* (WT, A732 y ATCC-16404) fueron analizadas para producir enzimas xilanólíticas mediante el ensayo de rojo congo con xilano de madera de haya en un medio sólido. Se realizó un análisis factorial del pH y temperatura óptima con efectos sobre la actividad enzimática en cultivo con salvados de trigo y salvado de avena. Se seleccionaron los mejores tratamientos en un cultivo optimizado. Se analizó el perfil de xilanasas por zimografía bajo condiciones semi desnaturalizantes. El análisis cualitativo del ensayo con rojo congo seleccionó las cepas A732 y WT como cepas productoras de xilanasas. Los resultados del análisis factorial demostraron que la mayor actividad xilanasasa en la fermentación en estado sólido con salvado de avena cuando se usó *Aspergillus niger* A732 bajo dos condiciones a pH 5.55 - 28°C y pH 6.8 a 28°C. Dichos tratamientos bajo condiciones de cultivo optimizado no tuvieron diferencia significativa entre los valores estimados. Para ambos tratamientos se alcanzó hasta 5 U/ml de actividad xilanólítica y 19 mg/ml en equivalentes de azúcares reductores, empleando una curva estándar de xilosa. La zimografía mostró dos enzimas activas de 20 y 25 kDa. Se logró la producción de xilanasas mediante un sistema de cultivo en fase sólida empleando un material lignocelulósico económico bajo condiciones de cultivo optimizadas para el cultivo de *Aspergillus niger*.

(Palabras clave: Xilano, xilanasas, cultivo sólido, *Aspergillus*)

SUMMARY

The production of *Aspergillus* xylanases is increasing; nevertheless, its production is barely profitable due to the elevated costs created by cultures that use purified xylans. For this reason some lignocellulosic materials are used for growing microorganisms that produce xylanases through solid state fermentation. Objective: To analyze the production of xylanases by strains of *Aspergillus niger* in solid state fermentation on oat bran and wheat bran. Three strains of *Aspergillus niger* (WT, A732 and ATCC-16404) were analyzed to produce xylanolytic enzymes using the congo red test with xylan from beech wood in a solid médium. A factor analysis was carried out of the pH and optimal temperatura with effects on the enzymatic activity present in cultures with wheat bran and oat bran. The best treatments were selected in an optimized culture. The profile of xylanases was analyzed by zymogram analysis under semi – denaturing conditions. A qualitative analysis of the congo red test selected strains A732 and WT as strains that produce xylanases. Results of the factor analysis showed that the greatest xylanase activity was in solid state fermentation with oat bran when *Aspergillus niger* A732 was used under two conditions, pH 5.55 – 28 °C and pH 6.8 at 28 °C. These treatments under optimized culture conditions showed no significant difference between the estimated values. For both treatments up to 5 U/ml of xylanolytic activity and 19 mg/ml in equivalentents of reducing sugars was reached, using a standard xylose curve. The zymogram analysis showed two active enzymes of 20 and 25 kDa. Production of xylanases was achieved using a system of solid state fermentation, employing an economical lignocellulosic material under optimized culture conditions for the *Aspergillus niger* culture.

(Key words: Xylan, xylanases, solid state fermentation, *Aspergillus*)

Dedicado con mucho cariño a mi mamá
Sra. Geicel Islas Gómez y familia.

AGRADECIMIENTOS

- Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez, por sus enseñanzas y aportaciones a este proyecto de tesis.
- A mi comité de sinodales, por sus valiosas observaciones durante la elaboración de este trabajo.
- A las secretarias del departamento de posgrado en alimentos (DIPA), Carmen Campos y Laurita, por su ayuda brindada durante la maestría.
- Universidad Autónoma de Querétaro, por el honor de haber pertenecido a sus aulas y ser mi segunda alma máter.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los apoyos económicos brindados durante mi estancia como alumno de maestría en esta honorable institución.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Hemicelulosa de los tejidos vegetales	2
2.2 Conversion de la hemicelulosa	4
2.3 Hidrólisis enzimática del xilano	7
2.4 Regulación transcripcional de las hemicelulasas	8
2.5 Clasificación de las xilanasas	10
2.6 Métodos de producción de xilanasas	12
2.7 Microorganismos productores de xilanasas	14
2.7.1 Bacterias productoras de xilanasas	14
2.7.2 Hongos productores de xilanasas	15
2.8 Perspectivas de las xilanasas en la industria de alimentos	17
3 JUSTIFICACIÓN	18
4 HIPÓTESIS	19
5 OBTETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivo específicos	20
6 METODOLOGÍA	21
6.1 Materiales	21

6.1.1	Equipos e instrumentos	21
6.1.2	Medios de cultivo	21
6.1.3	Reactivos	22
6.1.4	Materiales lignocelulosicos	23
6.1.5	Cepas de hongos filamentosos	23
6.2	Métodos	24
6.2.1	Estrategia general de trabajo	24
6.2.2	Diseño y análisis estadístico	25
6.2.3	Procedimientos generales	25
6.2.3.2	Preparación de inóculos de las cepas de <i>Aspergillus</i>	25
6.2.3.3	Recuento de esporas en cámara de Neubauer	26
6.2.3.4	Preparación del soporte lignocelulósico para el cultivo sólido	27
6.2.3.5	Determinación de actividad de agua (aw)	27
6.2.3.6	Condiciones de cultivo sólido para el análisis factorial	27
6.2.3.7	Condiciones de cultivo sólido optimizado	28
6.2.3.8	Determinación de proteína extracelular por el método de Bradford	29
6.2.3.9	Determinación de azúcares reductores por método de DNS	29
6.2.4.0	Tinción de plata	30
6.2.4.1	Evaluación cualitativa de cepas de <i>Aspergillus</i> productoras de xilanasas	31
6.2.4.1.1	Determinación de halos de hidrólisis	31
6.2.4.2	Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática endo- β -1,4-xilanasas de las cepas de <i>Aspergillus niger</i>	32

6.2.4.3	Análisis de proteínas con actividad xilanasa y perfil de proteínas extracelulares de <i>Aspergillus niger</i>	33
6.2.4.3.1	Preparación de geles de SDS-PAGE	33
6.2.4.3.2	Procedimiento de carga de muestras en geles de SDS-PAGE	34
6.2.4.4	Determinación de actividad enzimática endo- β -1,4-xilanasa por zimografía	34
7 RESULTADOS Y DISCUSIONES		
7.1	Evaluación cualitativa de cepas de <i>Aspergillus</i> productoras de xilanasas	35
7.2	Preparación del soporte lignocelulósico para el cultivo sólido	35
7.3	Análisis estadístico de factores que modifican la actividad enzimática xilanolítica	38
7.4	Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática xilanolítica de la cepa de <i>Aspergillus niger</i> WT en cultivo sólido de salvado de trigo y salvado de avena	38
7.5	Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática xilanolítica de la cepa de <i>Aspergillus niger</i> A732 en cultivo sólido de salvado de trigo y salvado de avena	40
7.6	Análisis de la proteína extracelular sobre la producción global de azúcares reductores	43
7.7	Análisis de la actividad enzimática xilanolítica sobre el perfil de liberación de azúcares reductores	45
7.8	Análisis del perfil de producción de xilanasas bajo condiciones óptimas	47
8 CONCLUSIONES		49
9 BIBLIOGRAFÍA		50
APÉNDICE A		57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros		Página
2.6.1	Composición de la biomasa lignocelulósica de varios residuos agrícolas.	14
2.6.2	Comparación entre el sistema de cultivo en fase sólida y el sistema en fase sumergida.	15
6.2.2	Tratamientos del diseño factorial.	27
6.2.3.8	Procedimiento para el análisis de proteína.	32
6.2.3.9.1	Procedimiento para el análisis de azúcares reductores.	32
6.2.6.1.1	Preparación de geles de poliacrilamida al 10%.	36
7.1.1	Análisis de los halos de hidrólisis obtenidos por las cepas de <i>Aspergillus</i> .	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1.	Modelo de la pared celular de la biomasa vegetal.	3
2.2.	Esquema que representa el tratamiento químico para la remoción de hemicelulosa de la biomasa.	6
2.3.1.	Estructura del xilano y su interacción con enzimas hemicelulolíticas. AGU; α -glucoronidasa, XLN; β -1,4-endoxilanasas, AXH; α -arabinofuranosidasa, FAE; feruloil esterasa, AXE; acetilxilanoesterasa, BXL; β -1,4-xilosidasa.	8
2.4.	Regulación del proceso transcripcional de las xilanasas en <i>Aspergillus</i> .	10
2.5	Estructura de las xilanasas pertenecientes a familia 10 (A) y familia 11 (B). Del lado izquierdo se muestran la estructura conformacional y del lado derecho se muestran los residuos que conforman el sitio catalítico resaltados en negro.	13
6.2.1	Diagrama general de trabajo.	26
7.2.1.	Influencia del medio de cultivo ISP-3 con el salvado de trigo con cuatro tamaños de partícula sobre la actividad de agua (\times : salvado entero (≈ 5 mm), Δ : salvado grande (3.36 mm), \blacksquare : salvado mediano (2.38 mm), \blacklozenge : salvado fino (1.00 mm))	39
7.2.2.	Influencia del medio de cultivo ISP-3 y su contenido de salvado de avena entero sobre la actividad de agua	40
7.3.1.	Actividad xilanasa de <i>Aspergillus niger</i> WT en cultivo sólido de salvado de trigo a diferentes tratamientos de pH y temperatura	42
7.3.2.	Actividad xilanasa de <i>Aspergillus niger</i> WT en cultivo sólido de salvado de avena a diferentes tratamientos de pH y temperatura	43
7.4.1.	Actividad xilanasa de <i>Aspergillus niger</i> A732 en cultivo sólido de salvado de avena a diferentes tratamientos de pH y temperatura	44
7.4.2.	Actividad xilanasa de <i>Aspergillus niger</i> A732 en cultivo sólido de salvado de avena a diferentes tratamientos de pH y temperatura	45

7.5.1	Evaluación del contenido de proteína y su relación con la producción de azúcares reductores. (pH 6.8 – 28 °C: cuadrado - proteína y círculo - azúcares; pH 5.55 – 28 °C: triángulo - proteína y rombo - azúcares)	47
7.6.1	Evaluación de la actividad xilanasa y su relación con la producción de azúcares reductores. (pH 6.8 – 28 °C: cuadrado - proteína y círculo - azúcares; pH 5.55 – 28 °C: triángulo - proteína y rombo - azúcares)	49
7.7.1	Geles de poliacrilamida del cultivo de <i>Aspergillus niger</i> A732 en fase sólida: 1) Salvado de avena: (a) marcador (b) SDS-PAGE con tinción de plata (c) zimograma. 2) Salvado de avena: (d) zimograma (e) SDS-PAGE con azul de Coomassie.	50

1. INTRODUCCIÓN

La degradación enzimática de los xilanos en harinas empleadas en la fabricación de pan, permite conseguir mejores características reológicas durante el amasado (Courtin y Delcour, 2002; Butt y col., 2008). Los beneficios de las xilanasas en los procesos de panificación se deben a un aumento de la flexibilidad de la masa, incremento del volumen del pan, aumento en el grado de retención del agua y mejoramiento de la vida útil (Rouau y col., 1994; Bhat, 2000). El aumento del volumen del pan se explica por la acción de las xilanasas que causan una redistribución del agua entre los arabinoxilanos insolubles e interacciones con las fracciones del gluten formado, lo que propicia un incremento en el volumen de la masa y posterior crecimiento en el horneado (Romanowska y col., 2006).

Las xilanasas pueden obtenerse de fuentes microbianas como bacterias y hongos. Los hongos pueden producir una variedad de β -xilanasas inducidas por xilanos, los cuales son sustratos caros que hacen poco rentable su producción incrementando los costos del proceso. Materiales lignocelulósicos como el bagazo de caña de azúcar, el rastrojo de maíz, granos de cereales, salvado de trigo y salvado de avena se han usado como sustratos para el crecimiento de los microorganismos por medio de cultivos en fase sólida, el cual es un método de cultivo llevado a cabo sobre un material no soluble que actúa como un soporte físico y como una fuente de nutrientes (Betini y col., 2009). Esta forma de cultivo ha sido usado como una herramienta útil en la producción compuestos con valor agregado como edulcorantes, etanol, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios con actividad biológica y xilanasas (Rodríguez y Sanromán, 2006). En este trabajo se estudió la producción de xilanasas por *Aspergillus niger* mediante un cultivo en fase sólida ocupando dos de los sustratos agrícolas de mayor uso en la industria de la panificación, el salvado de trigo y salvado de avena, con el fin de caracterizar la actividad enzimática endo- β -1,4 xilanasas de cepas productoras.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hemicelulosa de los tejidos vegetales

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante en la biomasa vegetal, representa entre un 20 a un 35% de la biomasa, además se encuentra asociada a polímeros como la celulosa y la lignina que en conjunto contribuyen a la rigidez o flexibilidad de la pared celular, de acuerdo a la figura 2.1. (Cosgrove,1997). La hemicelulosa consta de un conjunto de biopolímeros que se caracterizan por una estructura química heterogénea formado de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares ácidos (Saha, 2003). La variación depende siempre del tipo de especie vegetal, estado del desarrollo y tipo de tejido que se analice (Wyman y col., 2005). Se conoce que algunos materiales en la naturaleza como las maderas de corteza rígida contienen mayores cantidades de xilanos, mientras que materiales vegetales más suaves (plantas herbáceas) están compuestos en forma mayoritaria de glucomananos. Además, se ha reportado que el contenido de xilanos puede variar hasta un 50% en tejidos de cereales y zacates (Ebringerova y col., 2005).

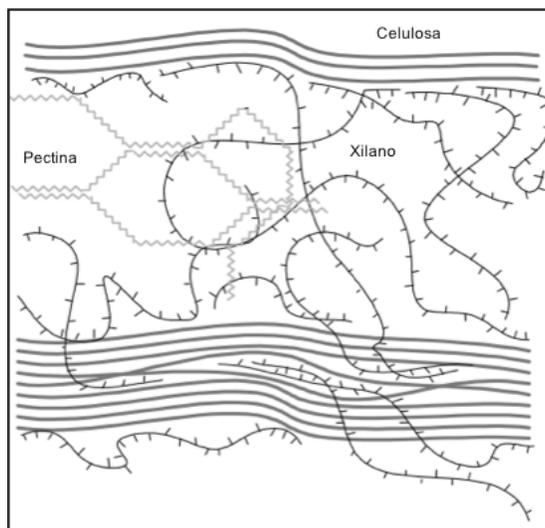


Figura 2.1. Modelo general de la pared celular de la biomasa vegetal.

En los cereales, los arabinoxilanos son los polímeros mayoritarios. Estos constituyen de un 4 a un 8% en los granos de cebada y representan un 25 y 70% de los polisacáridos de la pared celular del endospermo y capa de la aleurona, respectivamente. Los arabinoxilanos son particularmente solubles en agua y resultan en un aumento de la viscosidad en las soluciones acuosas (Dervilly y col., 2001). Los xilanos de los cereales contienen grandes cantidades de L-arabinosa por ellos son referidos por lo general como arabinoxilanos, mientras que en maderas duras los xilanos son referidos como glucoronoxilanos por poseer grandes cantidades de ácido D-glucorónico unido a la estructura base del xilano. Otro residuo en el xilano es la arabinosa la cual se enlaza por uniones α -1,2 y α -1,3 ya sea por residuos individuales del monosacárido o por cadenas cortas. En harinas de trigo, el contenido de arabinoxilanos ocurren en porcentajes menores entre un 2 y 3% de su composición expresada en base seca; asimismo estos compuestos se han sido clasificado dentro de dos grupos: arabinoxilanos solubles en agua y arabinoxilanos insolubles en agua (Butt y col., 2008). Estos juegan un rol importante en el comportamiento reológico de la masa y la calidad del pan (McClearly, 1986; Curtin y Delcour, 2002).

Los xilanos existentes en algunos materiales vegetales se encuentran en forma de heteropolisacáridos, con una base estructural de unidades de xilosa unido por uniones β -1,4 y formando una estructura en cadena (Jun y col., 2012). Además de la xilosa, los xilanos pueden contener arabinosa, ácido glucorónico o sus 4-*o*-metilésteres, ácido acético, ácido ferúlico y ácido *p*-cumarínico. Sin embargo, esta sustitución no es una regla general ya que se han aislado xilanos no sustituidos de residuos agrícolas como de la cáscara de semillas de guar, plantas herbáceas como el zacate esparco y tallos de café (Saha, 2003). Por lo que a la fecha se han categorización a los xilanos en: homoxilanos, arabinoxilanos, glucoronoxilanos y glucoronoarabinoxilanos.

El grado de sustitución del xilano corresponde a un 80%, lo cual corresponde a ramificaciones laterales de monosacáridos de arabinosa o ácido

glucorónico enlazados a residuos de xilosa en posición O-2 y O-3, así como cadenas de oligómeros que contienen arabinosa, xilosa y algunas veces galactosa. Cabe destacar que la frecuencia y composición de las ramificaciones dependen de la fuente del xilano (Jun y col., 2012).

Los xilanos pueden provenir de diferentes fuentes vegetales fibrosas tal como zacates, cereales, maderas de blandas y duras, las cuales difieren en composición. El xilano de madera de abedul contiene un 89.3 % de xilosa, 1 % arabinosa, 1.4 % glucosa, y 8.3 % ácido anhidrouónico; el xilano del salvado de arroz contiene un 46 % de xilosa, 44.9 % de arabinosa, 6.1 % galactosa, 1.9 % glucosa y 1.1 % ácido anhidrouónico; el arabinoxilano de trigo contiene 65.8 % de xilosa, 33.5 % arabinosa, 0.1 % manosa, 0.1 % galactosa y 0.3 % glucosa y el xilano de maíz contiene un 48-54 % de xilosa, 33-35 % arabinosa, 5-11 % galactosa y 3-6 % de ácido glucorónico (Saha, 2003).

Los xilanos presentes en las maderas suaves contienen residuos de arabinofuranosilo esterificados con ácido *p*-cumarínico y ácido ferúlico. Mientras que, los xilanos en maderas duras contienen un 60-70 % de residuos de xilano en forma acetilada. El grado de polimerización de los xilanos de madera dura es alto (150-200) mientras que el de madera suave es de 70-130 (Saha, 2003).

Las hemicelulosas, compuestas principalmente por hidrocoloides, se clasifican en base a varias propiedades tal como su capacidad para proporcionar energía extracelular, por su capacidad de servir como sistema de almacenamiento de materiales y por su capacidad de retención de agua en algunos tejidos como las semillas (Wyman y col., 2005).

2.2. Conversión de la hemicelulosa

La hemicelulosa puede ser convertida a varios productos, usando métodos químicos o biológicos. Sin embargo, para ello se requiere previamente

una hidrólisis de los polisacáridos a sus unidades básicas correspondientes. Generalmente, la hidrólisis química de la hemicelulosa es mucho más fácil que la hidrólisis de la celulosa, debido a diferentes factores como la heterogeneidad estructural, su composición química, bajo grado de polimerización y baja cristalinidad. En algunos casos, la hemicelulosa es comúnmente removida durante el estado inicial del procesamiento de la biomasa, con el objetivo de reducir las limitaciones estructurales que le interfieren a la hidrólisis de la celulosa (figura 2.2.1.)

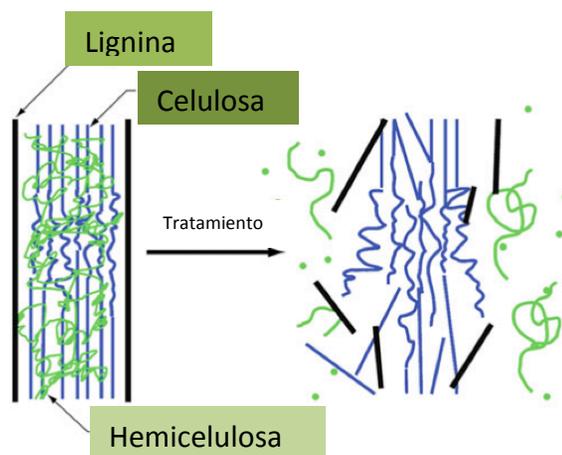


Figura 2.2.1. Esquema que representa el tratamiento químico para la remoción de hemicelulosa de la biomasa.

En años recientes, la conversión de la hemicelulosa ha recibido notable atención debido a sus aplicaciones prácticas en varios sectores de procesamiento agroalimentario. La conversión microbiana de la hemicelulosa se ha sugerido como una alternativa limpia y renovable de hacerlo. Para ello, los microorganismos producen enzimas que actúan en forma específica sobre los polisacáridos estructurales de la hemicelulosa. Sin embargo los polisacáridos estructurales como la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas forman un modelo altamente empaquetado y organizado, contienen diferentes tipos de azúcares residuales que ramifican en una gran diversidad de estructuras. Para la degradación eficiente de estos polisacáridos, algunos microorganismos procariontes (bacterias) y eucariontes (hongos), producen enzimas activas sobre estos polímeros,

denominadas por su forma genérica como lignocelulasas y hemicelulasas (Brink y Vries, 2011).

En general, los microorganismos pueden dividirse en tres grupos de acuerdo a su estrategia de hidrólisis de la hemicelulosa: 1) Mediante hidrólisis enzimática con varias hemicelulasas libres y producidas por excreción y cuyos productos de hidrólisis se obtienen monosacáridos y disacáridos. 2) Por hidrólisis parcial extracelular mediante hemicelulasas asociadas a la membrana o hemicelulasas internas, que pueden generar productos más pequeños como oligosacáridos. 3) Mediante hidrólisis por complejos enzimáticos extracelulares y asociados a la pared celular llamados celulosomas, los cuales pueden presentar varias actividades enzimáticas que degraden a la celulosa y hemicelulosa (Xiao y col., 2012).

La conversión de la hemicelulosa tiene gran importancia en procesos de obtención de sustancias químicas con valor agregado como el xilitol, el cual es un monosacárido de la familia de los polioles de gran interés clínico por sus efectos benéficos a la salud y de interés para diferentes industrias como la farmacéutica y de alimentos; así como, de otras sustancias como el 2,3-butanodiol para la industria de los biocombustibles, el cual representa una alternativa renovable de combustible de bajo costo y genera menos impacto ambiental (Badal, 2003). En la industria del papel, las xilanasas son empleadas para lograr la remoción del complejo lignina-carbohidrato, generado durante el proceso Kraft, debido a que dicho complejo representa una barrera física que impide la entrada de sustancias activas que blanquean las fibras o la pulpa del papel, lo cual mejora el rendimiento del blanqueado y propicia una reducción en el empleo de sustancias cloradas que generan subproductos que son tóxicos y que representan un riesgo a la salud (Betini y col., 2009).

2.3. Hidrólisis enzimática del xilano

El xilano es un componente mayoritario en la hemicelulosa. Éste consiste en una estructura base homopolimérica de unidades de β -D-xilopiranosas. Dependiendo de su origen, la estructura base puede estar altamente sustituida por grupos de residuos acetilo, arabinosa y ácidos glucorónico, ferulico y cumarinico, los cuales entrecruzan a la hemicelulosa y a la lignina. Estos grupos sustituyentes son un factor limitante que impiden una hidrólisis enzimática eficiente del sustrato (Xiao y col., 2012). Por otro lado, para la hidrólisis completa del xilano se requiere de la acción sinérgica de un número de enzimas xilanolíticas que tienen la capacidad de cortar la cadena principal y sitios de la cadena (figura 2.3.1.).

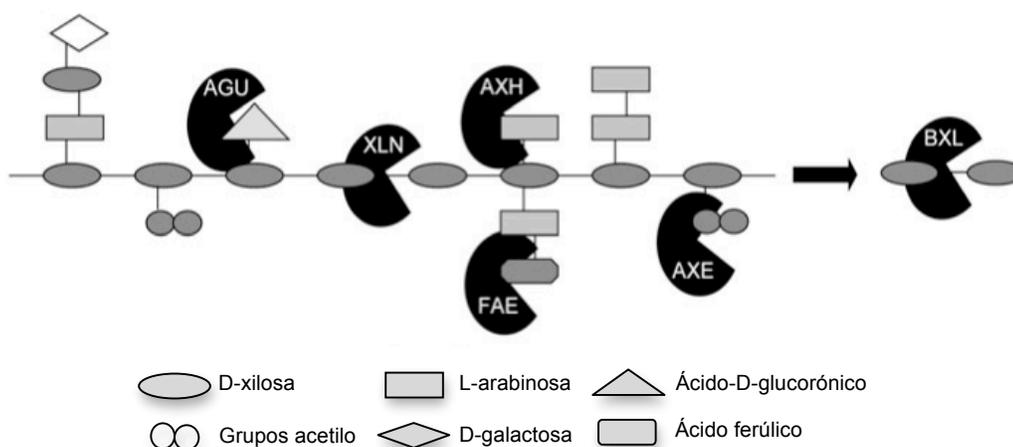


Figura 2.3.1. Estructura del xilano y su interacción con enzimas hemicelulolíticas. AGU; α -glucoronidasa, XLN; β -1,4-endoxilanasas, AXH; α -arabinofuranosidasa, FAE; feruloil esterasa, AXE; acetilxilanoesterasa, BXL; β -1,4-xilosidasa (Adaptada de Brink y Vries, 2011).

Para la degradación del xilano se requieren de endo- β -1,4-xilanasas que causan un decremento en el grado de polimerización del sustrato, β -xilosidasas que hidrolizan xilooligosacaridos a xilosa, y varias enzimas accesorias como la α -L-arabinofuranosidasa, α -glucosidasa, acetilesterasas, ácido ferulicoesterasa y ácido *p*-cumarínicoesterasa, que son necesarias para la hidrólisis de varios

sustituyentes del xilano. La β -xilosidasa hidroliza a los xilooligosacáridos a xilosa. La α -arabinofuranosidasa y la α -glucuronidasa remueve la arabinosa y el 4-O-metil ácido glucorónico, respectivamente, de la cadena principal del xilano. Las esterasas hidrolizan las uniones éster entre las unidades de xilosa y el ácido acético (acetilxilanoesterasas) o entre residuos de arabinosa de la cadena y ácidos fenólicos (ácido ferúlico esterasa) y ácido *p*-cumarínico (ácido *p*-cumarínico esterasas), que remueven los sustituyentes en la cadena del heteroxilano (Rahman y col., 2003).

2.4. Regulación transcripcional de las hemicelulasas

Como se ha dicho para la degradación de la pared celular de la plantas es necesario un complejo enzimático que actúa en forma sinérgica. En los hongos filamentosos este consorcio de enzimas permite la degradación de la pared celular por medio de enzimas celulasas, hemicelulasas, pectinasas y ligninasas, que permiten al hongo obtener nutrientes y energía a partir de los componentes asimilables de la pared celular; además se contribuye a incrementar la accesibilidad del hongo en la planta con los procesos de hidrólisis enzimática y por lo tanto incrementar en algunas ocasiones su capacidad patogénica cuando el hongo produce una enfermedad en la planta.

Por otro lado, la regulación de los genes que codifican a las enzimas que atacan la lignocelulosa, entre ellas a las hemicelulosas, se basa en la respuesta energética de consumo de energía. Para esto es necesario la regulación de genes que codifican a un consorcio de enzimas lignocelulolíticas y hemicelulolíticas y lleven a cabo la degradación de la pared celular de los tejidos vegetales y además, se aseguran que este consorcio de enzimas se produzcan bajo condiciones en las que hongo necesite usar biopolímeros vegetales como fuente de energía.

La expresión de genes que codifican enzimas hemicelulolíticas y lignocelulolíticas puede presenta fenómenos de entrecruzamiento en la inducción

de los genes que las codifican (figura 2.4.). Por tanto, un mismo biopolímero (lignocelulosa ó hemicelulosa) puede promover la expresión tanto de celulasas y hemicelulasas con diferentes niveles de expresión.

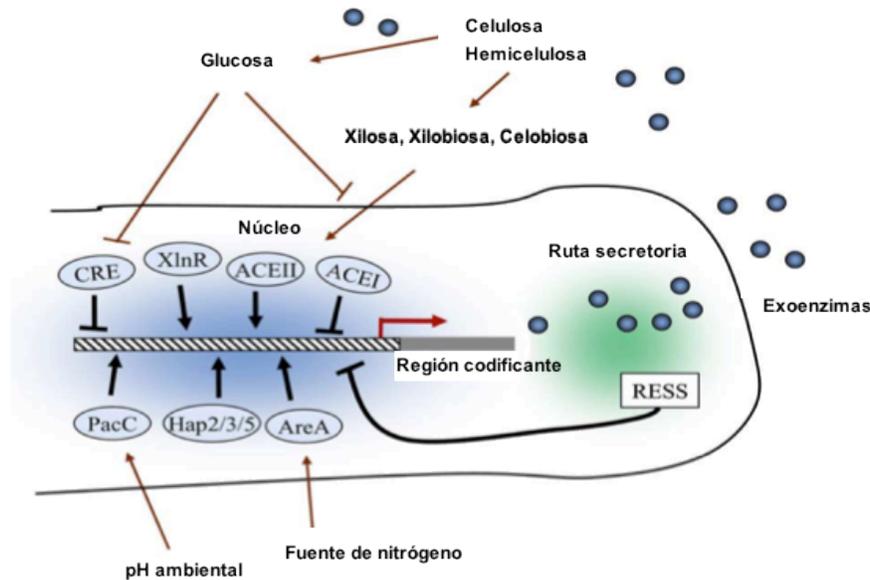


Figura 2.4. Regulación del proceso transcripcional de las xilanasas en *Aspergillus* (Adaptada de Aro y col., 2011).

Con respecto a la inducción de azúcares, se ha estudiado y demostrado la expresión de hemicelulasas en especies de *Aspergillus* y *Trichoderma reesei*. Generalmente, la presencia de hemicelulosas de xilano, arabinosa y manosa, y algunos compuestos derivados de estos polímeros, provocan una alta producción de hemicelulasas. Tanto la hemicelulosa, como la celulosa, son demasiado grandes para entrar a la célula, por lo que las moléculas mas pequeñas derivadas de esta son las que juegan un rol en la activación de los genes. Sin embargo, aún no es posible descartar la posibilidad de que la señal de inducción pueda provenir del espacio extracelular o que los polímeros mas largos estén involucrados en la inducción.

Los genes que codifican a las enzimas xilanolíticas en especies de *Aspergillus* son inducidas por el monosacárido de D-xilosa. Además, la xilobiosa y

el heterodisacárido de D-glucosa- β -1,2-D-xilosa también inducen la expresión de genes xilanolíticos. La D-xilosa induce la expresión de varios otros genes que codifican xilanasas en *Aspergillus niger*, incluyendo genes que codifican enzimas que cortan sitios de la cadena entre las que se encuentran la α -glucoronidasa (*aguA*), acetil xilano esterasa (*axeA*) y feruloil esterasa (*faeA*) (Aro y col., 2011).

Por otra parte, la expresión de genes de xilanasas depende del pH ambiental en el medio de cultivo. La expresión de las xilanasas se ha estudiado en detalle en *Aspergillus nidulans* y se sabe que el factor transcripcional PacC actúa como un activador de la expresión de genes en condiciones de pH alcalino. PacC presenta un control sobre la enzima poliendogalacturonidasa involucrada en la degradación de pectina y de las xilanasas. (Aro y col., 2005).

2.5. Clasificación de las xilanasas

En el pasado, los sistemas de clasificación de las xilanasas se hacía en función a su modo de acción. Otros autores emplearon un sistema de clasificación en base en a la liberación de arabinosa como un factor discriminante. Sin embargo, estas clasificaciones fueron poco populares y poco útiles. Por lo que en la actualidad las xilanasas se clasifican de acuerdo a su información genética y análisis estructural.

Una forma útil para clasificarlas está basada en el análisis de sitios hidrofóbicos y alineamientos de secuencias, lo cual ha permitido su agrupación por familias de glucohidrolasas, tales como la familia 10 (formalmente llamada familia G) y la familia 11 (formalmente llamada familia H). Además, se sabe que otras familias tales como la 5, 8 y 43 presentan una o dos enzimas con actividad xilanasas (Xiao y col., 2012).

Las xilanasas son glicoproteínas de una sola cadena que pueden estar en un rango de pesos moleculares entre 6 y 80 kDa (Butt y col., 2008). La estructura

de la familia de xilanasas pertenecientes a la familia 10 son descritas como un barril de 8 plegamientos en conformación β/α , el sitio activo tiene una estructura en hendidura abierta y los residuos que conforman el sitio catalítico son un par de glutamatos (figura 2.5.). Estas enzimas pueden presentar un peso molecular relativamente alto y presentan arreglos conformacionales en estructuras cuaternarias de mayor peso molecular o que pueden presentar mas de una subunidad en su estructura proteica que las hacen más complejas que las xilanasas de la familia 11. Una característica adicional es su capacidad de formación de oligosacáridos con un bajo grado de polimerización. La familia 11 está conformada por un único dominio elipsoidal comprendiendo una conformación de dos laminas β y sólo tres α -helices (figura 2.5.). Las xilanasas pertenecientes a este grupo tiene pesos moleculares más bajos en comparación con la familia 10 y no presentan un sitio de unión al sustrato. Esta clase de enzimas suelen tener mayor especificidad por el xilano y producir oligosacáridos de cadena larga (Curtin y Delcour, 2002).

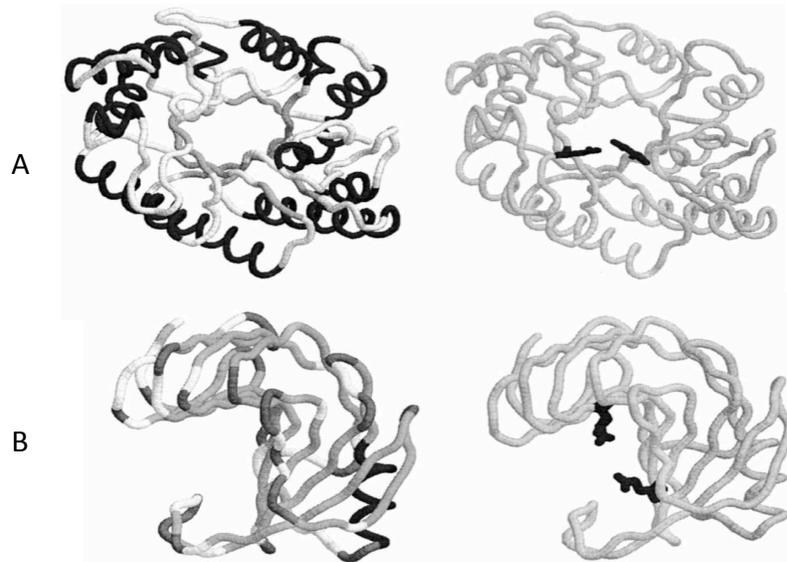


Figura 2.5. Estructura de las xilanasas pertenecientes a familia 10 (A) y familia 11 (B). Del lado izquierdo se muestran la estructural conformacional y del lado derecho se muestran los residuos que conforman el sitio catalítico resaltados en negro (Curtin y Delcour, 2002).

2.6. Métodos de producción de xilanasas

Las xilanasas representan uno de los mercados comerciales de mayor éxito entre las hemicelulasas comerciales, éstas representan un mercado de ganancias de alrededor de los 200 millones dólares. Una tendencia creciente en las ventas generadas por su comercialización, se deben a su uso potencial en aplicaciones en la industria de alimentos y otras más.

Como se mencionó las xilanasas microbianas son inducidas por xilanos, los cuales hacen altamente costoso el proceso de producción. Por ello el uso de subproductos agrícolas, que resultan ser abundantes y de bajo costo como sustratos en los procesos de fermentación para la producción de xilanasas, es una de las alternativas sustentables para reducir los costos de producción.

Cuadro 2.6.1. Composición de la biomasa lignocelulósica de varios residuos agrícolas

	Composición (% base seca)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Fibra de maíz	15	35	8
Mazorca de maíz	45	35	15
Rastrojo de maíz	40	25	17
Salvado de arroz	35	25	12
Salvado de trigo	30	50	20
Bagazo de caña de azúcar	40	24	25
Pasto varilla (Switchgrass)	45	30	12
Pasto de la costa de Bermuda	25	35	6

Adaptada de Saha, 2003

Entre las tecnologías existentes para la producción industrial de las xilanasas, se encuentra la fermentación en fase sólida (SSF, por sus siglas en inglés). Ésta muestra algunas ventajas sobre métodos de fermentación tradicionales de cultivo sumergido y bajo costo. Además, esta tecnología de cultivo permite el uso de diferentes materiales agrícolas o residuos agroindustriales como sustratos tal como el salvado de soya, salvado de trigo y el salvado de avena, materiales fibrosos como el bagazo de caña de azúcar, piel de limón y naranja,

entre otros. Enzimas xilanolíticas son producidas satisfactoriamente usando sustratos sólidos como granos de maíz, salvado de trigo, salvado de arroz, cabezas de cempasúchil, pasta de uvas (Betini y col., 2009).

Cuadro 2.6.2. Comparación entre el sistema de cultivo en fase sólida y el sistema en fase sumergida

Factor	Fermentación en estado líquido	Fermentación en estado sólido
Sustratos	Sólidos solubles como los azúcares	Polímeros insolubles: materiales lignocelulósicos, almidón, celulosa, pectina, lignina
Agua	Consumo de agua	Limitado consumo de agua, bajas actividades de agua.
Calefacción metabólico	Fácil control de la temperatura	Baja capacidad de transferencia de calor.
Control de pH	Fácil control de pH	Sustrato sólido amortiguado
Escalado	Equipos industriales disponibles	Requiere de nuevo diseño de ingeniería
Consideraciones de energía	Consumo de mucha energía	Consumo de poca energía
Agitación mecánica	Buena homogenización	Preferible condiciones estáticas
Aeración	Limitada solubilidad del oxígeno.	Fácil aireación y gran superficie de intercambio de aire

Adaptada de Umsza y col., 2011

El principal criterio para la selección de un material lignocelulósico es su composición química destacando de ésta su contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa (Cuadro 2.6.1.). De esta última es indispensable conocer la fracción de xiloglucanos, glucomananos y galactomananos. De acuerdo a la relación en la que se encuentren formando parte del tejido vegetal, se podrá hacer una aproximación del rendimiento de la producción de xilanasas al emplear materiales lignocelulósicos destinados al cultivo sólido (Umsza y col., 2011).

El sistema de SSF se enfocó principalmente a la producción de consumibles, enzimas hidrolíticas, ácidos orgánicos, giberelinas, sabores y biopesticidas. Sin embargo, se han desarrollado nuevas modificaciones del cultivo en fase sólida con el fin sustituir los sistemas tradicionales de fermentación sumergida, los cuales son parte de los principales procesos industriales alimentario y farmacéutico.

SSF presenta ventajas teóricas sobre el cultivo de fermentación líquida algunas de las ventajas y desventajas del SSF contra el sistema de cultivo sumergido (Cuadro 2.6.2). La metodología del cultivo en fase sólida muestra además factores que deben manejarse con cautela durante su implementación, ya que se reportado que en estudios de fermentación controlada de SSF a nivel biorreactor tipo plato, la aeración muestra un efecto importante sobre la producción de xilanasas y otras enzimas hidrolíticas. Se sabe que la aeración saturada de agua permite un incremento de hasta 1,9 veces al ser comparado en los sistemas a falta de aeración como el cultivo sólido en matraz (Umsza y col., 2011).

2.7. Microorganismo productores de xilanasas

2.7.1. Bacterias productoras de xilanasas

Las bacterias, las levaduras y los hongos filamentosos pueden crecer sobre sustratos sólidos o mediante formas del cultivo sumergido. Los géneros bacterianos involucrados en la degradación de la biomasa vegetal son citados en la literatura. Gang y col., 2012 reportaron la caracterización de una xilanasas purificada de *Bacillus subtilis* con un peso molecular de 23.3 kDa y un punto isoeléctrico de 9.63 y alta actividad específica con valores cercanos a 36,633 U/mg. Otros estudios son además citados de esta forma en la literatura científica.

Muchos son los reportes de géneros bacterianos con capacidad para producir xilanasas, aisladas a partir de condiciones ambientales extremas

determinadas por su naturaleza de vida silvestre, se ha visto que confieren propiedades a sus enzimas, tales como resistencia a las altas concentraciones de álcali, altas concentraciones de acidez, altas concentraciones de sales y altas temperaturas. Estudios de este tipo son demostrados por Krishnaveni y Kowsalya (2011) quienes aislaron y caracterizaron cepas de *Bacillus cereus* a partir de aislados de suelo de un estuario, con capacidad de producir xilanasas. La caracterización bioquímica de estas enzimas mostro pesos moleculares de alrededor de 22 a 24 kDa. Dichas enzimas presentaron una temperatura óptima de actividad enzimática a los 30 °C a un pH óptimo de 8.0 y fueron tolerantes a concentraciones de sales en valores del 0.9 %. Estos y otros reportes de bacterias productoras de enzimas resistentes a condiciones de trabajo extremas las hacen factibles de ser explotadas para fines de uso industrial.

2.7.2. Hongos productores de xilanasas

Por otro lado los hongos filamentosos son organismos modelo para la producción de xilanasas debido a sus altas actividades enzimáticas. Además, los hongos se pueden desarrollar perfectamente sobre sustratos sólidos por medio de un crecimiento en hifas, lo cual promueve un crecimiento estable y permite una buena tolerancia a bajas actividades de agua (a_w), así como resistencia a condiciones de baja presiones osmótica. De esta forma los hongos son buenos candidatos para la producción de xilanasas en sistemas de fase sólida. El modelo de crecimiento en hifas permite una ventaja competitiva de los hongos filamentosos sobre el desarrollo unicelular de los microorganismos, ya que pueden colonizar el soporte sólido en forma más eficiente y aprovechar los nutrientes disponibles del soporte sólido. El crecimiento en hifas permite al hongo un mejor contacto sobre el soporte sólido; además de esto, la secreción de enzimas hidrolíticas de las hifas permite una mejor acción más eficiente de las enzimas permitiendo un incremento de la invasión del microorganismo y por tanto aumenta la accesibilidad de nutrientes disponibles. Los hongos no pueden transportar sustratos macromoleculares, sin embargo las hifas permiten un mejor contacto entre

la anatomía del hongo y la superficie del soporte sólido. El micelio del hongo sintetiza y excreta altas cantidades de exoenzimas hidrolíticas, resultando en una catálisis eficiente y los productos de la hidrólisis que corresponden a nutrientes simples (azúcares simples y proteínas) en contacto con el micelio, atraviesan de la membrana celular y promueven la biosíntesis y actividad metabólica del hongos filamentoso (Raimbault, 1998).

Entre los microorganismos productores de xilanasas citados en la literatura se encuentran algunas especies como *Streptomyces sp S38*, *Aureobasidium pullulans*, *Cochlibolus carbonum*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii* y *Aspergillus tubingensis* (Davies y Hennissat, 1995). *Trichoderma* y *Aspergillus* son dos de los géneros microorganismos más eficientes para producir enzimas xilanolíticas entre los hongos filamentosos. Sus enzimas son usualmente empleadas en la práctica industrial debido a su carácter GRAS (*generalmente reconocido como seguro*, por sus siglas en inglés).

El mecanismo de producción de enzimas en los hongos filamentosos por medio de secreción extracelular, se caracteriza por presentar altas tasas de rendimiento en comparación con las xilanasas de bacterias y levaduras. (Gupta y col., 2009). Haltrich y col. (1996) discuten que las enzimas xilanolíticas también pueden ser producidas por hongos filamentosos del tipo *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fosarium*, *Chaetomium*, *Humicola*, *Talaromices* y otros, de los cuales, el género *Aspergillus* ha sido más explorado (Peixoto y col., 2009). Algunos hongos como *Penicillium campsulatum*, *Talaromyces emersonii*, y *Aspergillus niger*, poseen un complejo enzimático degradador de xilano. Bachmann y MacCarthy (1991) reportaron una interacción sinérgica significativa entre endoxilanasas, β -xilosidasa, α -arabinofuranosidasas y acetil esterasa de *Termomonospora fusca* conocido como un hongo actinomiceto termofilico. Las enzimas xilanolíticas de origen fúngico han recibido una gran atención en los

últimos años ya que diferentes especies de *Aspergillus* han sido reportadas como buenas productoras de xilanasas (Betini y col., 2009).

2.8. Perspectivas de las xilanasas en la industria de alimentos

La degradación enzimática del xilano ha encontrado diversas aplicaciones en diferentes industrias alimentarias y otras. Una de las áreas de mayor uso es la industria de la panificación debido a la degradación enzimática de los arabinoxilanos presentes en las masas. Las xilanasas rompen los componentes insolubles de la pared celular (pentosanos) resultando en la solubilización de los componentes, cuyos efectos se ven reflejados desde los procedimientos del amasado y un aumento del volumen del pan ya horneado. La adición de varias enzimas como hemicelulasas, amilasa, lipasa, glucosa oxidasa, celulasas y xilanasas sobre las propiedades físicas, químicas y sensoriales del pan se ha estudiado (Vries y col., 2010).

Otras aplicaciones de las xilanasas en la industria de alimentos va dirigida a mejorar la digestibilidad de materias primas para consumo animal, la clarificación de jugos, aunque no tan extenso como las enzimas degradadoras de pectinas, en la obtención de xilooligosacaridos caracterizados por conferir propiedades funcionales en los productos que los puedan contener ó como una alternativa endulzante. También se ha empleado en el mejoramiento de la consistencia de bebidas alcohólicas como la cerveza, mejoramiento de los rendimientos de maceración de futas y verduras y para el procesamiento de café y productos horneados altos en fibra.

3. JUSTIFICACIÓN

La industria de alimentos emplea un variedad de preparados enzimáticos de origen microbiano con el fin de mejorar cualidades sensoriales y de calidad que benefician la comercialización de sus productos en los mercados locales y de exportación. En la industria de la panificación es frecuente el uso de enzimas xilanolíticas de origen microbiano obtenidas a partir de hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, ya que las enzimas producidas por dicho microorganismo cuentan con un estatus GRAS que asegura su inocuidad y las hace útiles e idóneas en aplicaciones en la industria de la panificación. Sin embargo, la necesidad de producir xilanasas fúngicas tiene como objetivo la degradación eficiente del xilano presente en las harinas empleadas en los procesos en escala industrial, por lo que en la actualidad la producción biotecnológica de estas enzimas va encaminada a descubrir mejores alternativas que produzcan xilanasas con alta actividad, que reduzcan los costos de producción de estas enzimas y sean idóneas para la industria alimentaria. El objetivo de esta propuesta de trabajo fue investigar la actividad de xilanasas de cepas de *Aspergillus niger* capaces de degradar eficientemente una parte del complejo estructural de la hemicelulosa (xilano) contenido en el salvado de trigo y salvado de avena.

4. HIPÓTESIS

Es posible la producción de xilanasas en un cultivo sólido con un material lignocelulósico como el salvado de avena y salvado de trigo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la producción de xilanasas por cepas de *Aspergillus niger* en cultivo sólido sobre salvado de avena y trigo.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar las condiciones de crecimiento óptimas de *Aspergillus niger*.
2. Evaluar cuantitativamente cepas productoras de xilanasas en medio sólido.
3. Determinar la actividad enzimática endo- β -1,4-xilanasas de las cepas de *Aspergillus*.
4. Evaluar la producción de azúcares reductores de las cepas productoras de xilanasas de *Aspergillus niger*.
5. Analizar los perfiles de producción de xilanasas por *Aspergillus niger* en uno de los soportes.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

6.1.1. Equipos e instrumentos

- Agitador magnético, vortex- genie 2, scientific industries, modelo G540
- Agitador con movimiento orbital, Select bioproducts, modelo SBS500
- Autoclave eléctrica
- Balanza analítica, Santouriou
- Baño seco, MRC, modelo DB-005
- Cámara de electroforesis, Bio-Rad, mini PROTEIN tetra cell
- Centrifuga para microtubos de 2 ml, Hettich, modelo EBA21
- Espectrofotómetro, BOECO, modelo S22-UV-VIS
- Fotodocumentador Gel Doc™ XR+, Bio-Rad
- Fuente de poder para electroforesis, Amercham Pharmacia Biotech
- Higrómetro, Aqua-lab, modelo S3/S3TE
- Incubadora, MRC, modelo LOM-150
- Lector de microplacas
- Material de uso común en el laboratorio
- Micropipetas 1-1000 µl, RAININ, modelo c0837048k
- Microscopio óptico, Cogelliate, modelo 400
- Plato caliente con agitador magnético, Thermos científic modelo, sp131325
- Potenciómetro, Hanna instruments , modelo pH 209 meter
- Refrigerador ACROS

6.1.2. Medios de cultivo

- Agar bacteriológico

- Agar PDA

Ingredientes

Almidón de papa	4.0 g / l
Dextrosa	20.0 g / l
Agar	15.0 g / l

- Medio de cultivo ISP-3 (Ronald, 2006)

Ingredientes

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g / l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 g / l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g / l

Ajustado a pH 7

6.1.3. Reactivos

- Ácido acético glacial, JT Baker, Catálogo 9508-05
- Ácido clorhídrico, JT Baker, Catálogo 9535-05
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico, Sigma Aldrich, Catálogo D0550
- Azul de bromofenol
- Cloruro de sodio, JT Baker, Catálogo 3624-05
- Cloruro de manganeso heptahidratado
- Ditioneitol (DTT), Sigma Aldrich, Catálogo D0632
- Dodecil sulfato de sodio (SDS), JTBaker, Catálogo 4095-02
- Etanol
- Glicerol
- Glicina, JT Baker, Catálogo 4059-02
- Hidróxido de sodio en lentejas, Golden Bell, Catálogo 26800
- Marcador de peso molecular, Fermentas, destefido de 220 kDa
- Metanol , JT Baker, Catálogo 9070-03
- Persulfato de amonio (PSA), JT Baker, Catálogo 4030-00

- Rojo Congo
- Solución de acrilamida al 40%, Sigma Aldrich, Catálogo A7168
- Sero albúmina bovina (BSA)
- Sulfato ferroso heptahidratado
- Sulfato de zinc heptahidratado
- TEMED, JT Baker
- Tris-base, JT Baker
- Tritón X 100, Sigma Aldrich, Catálogo T8532
- Xilano de madera de haya, Sigma Aldrich, Catálogo X4252
- D-(+) Xilosa, Sigma Aldrich, Catálogo X1500

6.1.4. Materiales lignocelulolíticos

- Salvado de trigo
- Salvado de avena

6.1.5. Cepas de hongos filamentosos

- Se trabajó con tres cepas de *Aspergillus niger*: *Aspergillus niger* WT es una cepa nativa aislada de madera de café en descomposición, la cepa *Aspergillus niger* A732 (Catálogo: FGSC A732) pertenece a la colección de cepas del Fungal Genetic Stock Center y es descrita como un microorganismo para transformación genética, la cepa *Aspergillus niger* ATCC-16404 (Catálogo: 16404) pertenece a la colección del American Type Culture Collection (ATTC, por sus siglas en inglés) y es descrita como un microorganismo modelo para pruebas de control de calidad, pruebas de transformación genética y otras aplicaciones. Las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Fermentaciones de la UAQ - Facultad de Química a cargo del Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez. Las cepas se conservaron en medio de agar dextrosa papa (PDA) a 4° C hasta su uso.

6.2. Métodos

6.2.1. Estrategia general de trabajo

La estrategia consta de tres etapas principales: 1) Selección de cepas productoras de xilanasas. 2) Estandarización del cultivo sólido. 3) Caracterización de la actividad enzimática xilanolítica.

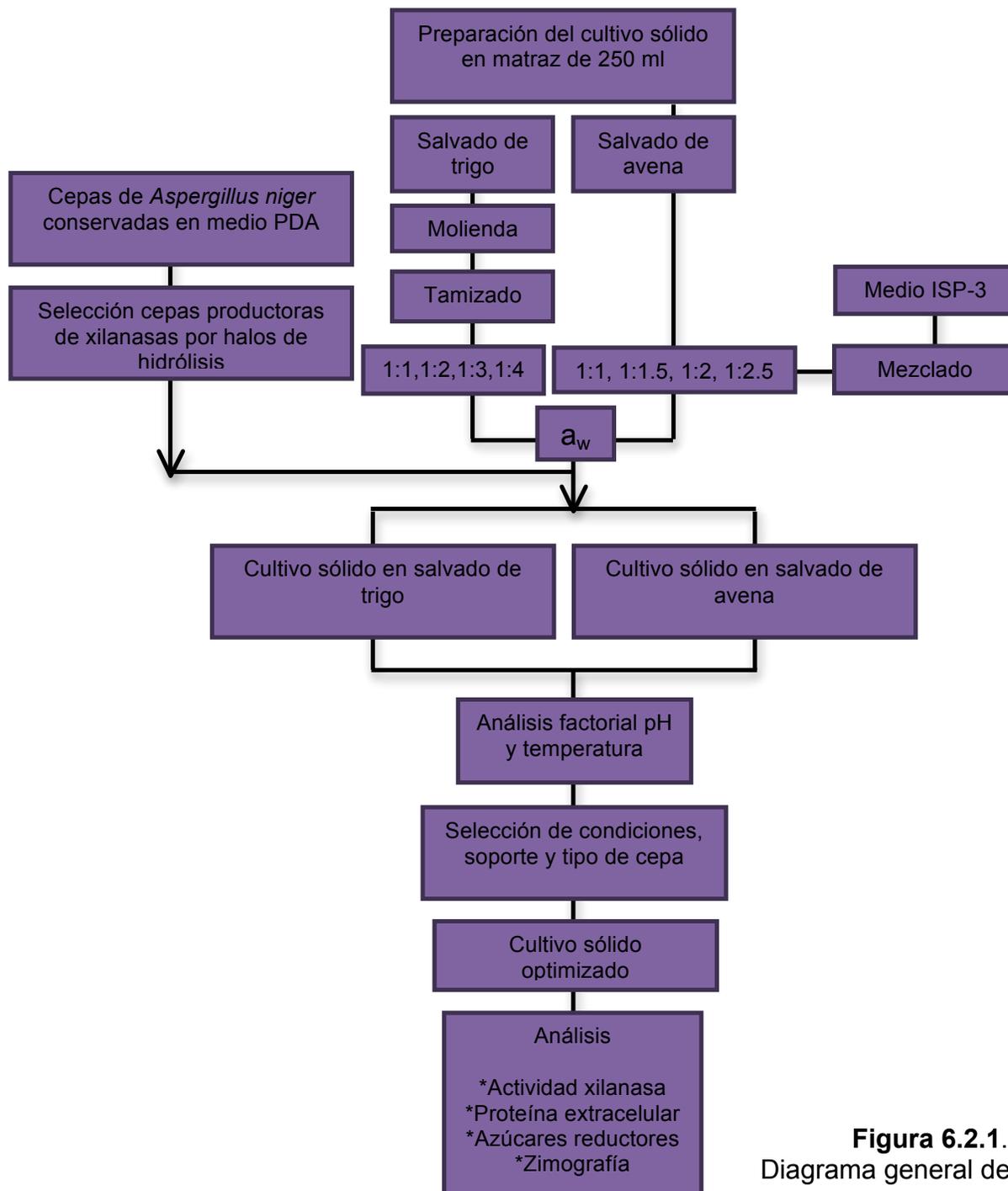


Figura 6.2.1.
Diagrama general de trabajo

6.2.2. Diseño y análisis estadístico

Para la determinación de halos de hidrólisis con rojo congo se realizó un diseño unifactorial completamente aleatorizado con tres réplicas por tipo de microorganismo. Posteriormente, para el análisis de los diámetros de los halos se realizó un análisis de ANOVA y seguido de la prueba de Tukey para la comparación de medias.

Para el análisis de la temperatura y pH óptimo se realizó un diseño factorial completamente aleatorizado con tres niveles de pH (4.8, 5.8 y 6.8) y temperatura (28, 35 y 45 °C).

Cuadro 6.2.2. Tratamientos del diseño factorial

Parcela completa	Temperatura (°C)	pH
1	28	5.55
1	28	6.8
2	45	4.8
2	45	6.8
3	45	5.8
3	45	6.8
4	28	6.8
4	28	4.8
5	36	5.6
5	36	5.48

6.2.3. Procedimientos generales

6.2.3.1. Preparación de inóculos de las cepas de *Aspergillus*

Las cepas mantenidas a 4 °C fueron resembradas en matraces con medio PDA sin gelificar a una temperatura de 45 °C, con ayuda de un asa bacteriológica se colectaron las esporas en condiciones estériles y se inocularon dentro del agar,

posteriormente se procedió a incubar los matraces 30 °C por 4 días hasta la generación de esporas.

Las esporas se recolectaron de acuerdo al siguiente procedimiento: se preparó en un matraz de 125 mililitros una solución 25 mililitros de tween 20 al 0.1 %, colocando previamente una barra magnética en su interior, se esterilizó mediante calor húmedo a 120 °C por 15 minutos. La solución se atempero evitando la solidificación. En condiciones estériles se vertió el contenido de la solución de tween 20 al cultivo de esporas y enseguida se colocó sobre un agitador magnético durante 2 minutos. Una vez cosechadas las esporas en 25 mililitros de solución de tween 20, se realizó un recuento de esporas presentes por mililitro en una cámara de Neubauer. Se realizó el cálculo por el método matemático de la regla de tres y se inoculó la cantidad de 1×10^4 esporas por mililitro en todos los cultivos.

6.2.3.2. Recuento de esporas en cámara de Neubauer

Para el recuento de esporas se preparó un matraz de 125 mililitros con 25 mililitros de una solución de tween 20 al 0.1 % y un agitador magnético estériles. El contenido se vertió a un matraz con esporas de *Aspergillus*. Las esporas fueron cosechadas con un agitador magnético, moviendo el matraz hasta cubrir toda la superficie y evitar la formación de espuma. Se recuperó la suspensión de esporas en el matraz sin formar espuma sobre un tubo Falcón de 50 mililitros. Con una pipeta estéril se tomaron 250 microlitros de la solución y se diluyeron en un matraz aforado de 25 mililitros con agua destilada. Se preparó la cámara de Neubauer limpiando con agua y secando con papel absorbente, sin tallar. Se lavaron los cubreobjetos de la cámara. Se colocó el cubre objetos sobre la cámara cuidando de cubrir las zonas de lectura. Se tomó una carga de 2 mililitros con una pipeta pasteur de las esporas diluidas. El llenado de la cámara se realizó tocando uno de los canales laterales con la pipeta sostenida en 45° aproximadamente, el líquido entró por capilaridad dentro de la cámara cuidando de no formar burbujas. Se

colocó la cámara al microscopio y se dejó reposar sobre la platina por un minuto. Se localizó la zona de lectura usando un objetivo de baja potencia (10X) y se pasó después a un objetivo de 40X. Se contabilizó la cantidad de esporas en 5 cuadros de 25 existentes en la parte central de la cámara de Neubauer, procurando evitar las lecturas dobles descartando los bordes izquierdos e inferiores de cada cuadro. Posteriormente para el cálculo de esporas se realizaron los cálculos según la siguiente fórmula:

$$E = \left[\frac{Et}{Ct} \right] (25 \times FD \times 1 \times 10^4)$$

E = Esporas / mililitro
 Et = Número de esporas totales
 Ct = Número cuadros contados
 DF = Factor de dilución

6.2.3.3. Preparación del soporte lignocelulósico para el cultivo sólido

Se empleó como soporte sólido al salvado de trigo y salvado de avena comerciales. Se trabajó con 500 gramos de salvado de trigo, se tamizó en tres diferentes números de malla de 1.00, 2.38 y 3.36 mm, se empleó el salvado entero como referencia. Posteriormente, se mezclaron los tamaños obtenidos con medio ISP-3 (Roland, 2006) en proporciones 1:1, 1:2, 1:3, 1:4. Para el caso del salvado de avena se trabajó con el material entero y se mezcló con medio ISP-3 en proporciones 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5. A las preparaciones obtenidas se les determinó la actividad de agua.

6.2.3.4. Determinación de actividad de agua (a_w)

Se empleó un equipo Aqualab el cual fue calibrado para su uso con agua destilada. Para la determinación de a_w se colocó un gramo de muestra en las charolas proporcionadas por el fabricante. Al cabo del tiempo se anota el valor de actividad de agua.

6.2.3.5. Condiciones del cultivo sólido para el análisis factorial

Para los cultivos sólidos se utilizaron matraces de 250 mililitros, empleando un solo matraz por tratamiento experimental. Se empleó como soporte al salvado de avena y salvado de trigo. Se inoculó la cantidad 1×10^4 esporas, tal como se describió en el apartado de la preparación del inóculo, y se incubó a diferentes temperaturas y condiciones de pH por un periodo de siete días. Cada 24 horas se realizó una toma de muestra del cultivo sólido. Para esto fue mezclado diariamente el contenido del matraz por medio de una espátula en condiciones estériles y fue pesado 0.5 gramos de muestra en tubos con tapón de rosca. Posteriormente, se realizó una extracción para lo cual se agregaron dos mililitros de agua destilada a cada tubo y se mezcló durante un minuto con un agitador mecánico, se filtró y se centrifugó el sobrenadante obtenido a 5000 g por un tiempo de 5 minutos y posteriormente se colectó un mililitro de sobrenadante. Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.2.3.6. Condiciones del cultivo sólido optimizado

El cultivo sólido fue hecho en matraces de 250 mililitros empleando un matraz independiente cada día del muestreo. Se empleó el soporte seleccionado de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis factorial y un inóculo inicial de 1×10^4 esporas. Las condiciones de incubación fueron seleccionadas de acuerdo a los mejores tratamientos del análisis factorial. Los muestreos se realizaron cada 24 horas durante 7 días, para ello fue necesario mezclar diariamente el contenido de cada uno de los matraces. El contenido de cada matraz se extrajo con 25 mililitros de agua destilada, se mezcló mediante agitación mecánica en un vortex y posteriormente se filtró a través de una malla de gasa colocada en un embudo. El contenido extraído de esta forma se recibió en tubos Falcon de 50 mililitros de capacidad, siendo necesario homogenizar el filtrado obtenido con un agitador mecánico y posteriormente se colectó una alícuota (2 mililitros) del filtrado en tubos Eppendorf® de dos mililitros de capacidad, se centrifugaron a 50000 g por 10 minutos y posteriormente se reservó un mililitro de líquido sobrenadante. Las muestras recolectadas de esta forma se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.2.3.7. Determinación de proteína extracelular por el método de Bradford

Se realizó una curva de calibración empleando una proteína de referencia de sero albúmina bovina (BSA) y se obtuvo con ello la ecuación de la recta para cálculos posteriores. Se prosiguió según las instrucciones del reactivo de Bradford comercial y se empleó el método en microplaca para la cuantificación, de acuerdo al Cuadro 6.2.3.8:

Cuadro 6.2.3.7. Procedimiento para el análisis de proteína

Ingrediente (μl)	Blanco	Problema	Estándar
Reactivo Bradford	250	250	250
Agua	5	*	*
Muestra	*	5	*
BSA	*	*	5

* No incluye al ingrediente en la mezcla de reacción.

Todas las reacciones preparadas se mezclaron durante 30 segundos, se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a su lectura en un equipo lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nanómetros. Para los cálculos se realizó mediante el método de la recta (Bradford,1976). Los resultados se expresaron como miligramos de proteína extracelular por mililitro.

6.2.3.8. Determinación de azúcares reductores por método de DNS

Se realizó una curva de calibración empleando al monosacárido de xilosa como estándar (ver anexo A) y se obtuvo con ello la ecuación de la recta para cálculos posteriores. Se siguieron las instrucciones de acuerdo a las condiciones propuestas por Miller (1959). Para ello se prepararon mezclas de acuerdo a lo establecido en el Cuadro 6.2.3.8.1.

Cuadro 6.2.3.8.1. Procedimiento para el análisis de azúcares reductores.

Ingrediente (µl)	Blanco	Problema	Estándar
Ácido dinitrosalicílico (DNS)	180	180	180
Agua	30	*	*
Muestra	*	30	*
Estándar de xilosa	*	*	30

* No incluye al ingrediente en la mezcla de reacción.

Una vez formadas las mezclas en tubos Eppendorf® de dos mililitros de capacidad, se procedió a incubar en tubos en un baño seco a una temperatura de 99 °C por un tiempo de quince minutos. Al finalizar la incubación se procedió a añadir 1200 microlitros de agua destilada a cada tubo de reacción. La mezclas fueron colocadas sobre un agitador mecánico por cuatro segundos. Se tomó un mililitro para su lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nanómetros.

6.2.3.9. Tinción de plata

Se colocó el gel de SDS en un contenedor limpio con solución fijadora agitando por 20 minutos con movimiento orbital. Se retiró el fijador, se lavó el gel con agua destilada y se dejó en más agua destilada por 20 minutos. Se retiró el agua y se repitió el lavado dos veces más (para un total de 60 minutos). Se retiró el último lavado y se colocó el gel en una solución sensibilizadora por dos minutos. Se retiró el sensibilizador y se colocó en agua destilada durante un minuto (se repitió una vez más). Se retiró el último lavado con agua y se colocó el gel en solución de nitrato de plata fría durante un tiempo de contacto de 30 minutos a 4 °C. Se retiró el nitrato y se lavó con agua destilada y posteriormente se colocó en más agua destilada durante un minuto, se repitió una vez más. Se añadió la solución de revelado y se agitó manualmente hasta alcanzar la intensidad deseada, en caso de ver turbidez de la solución de revelado se hace cambio de la solución inmediatamente. Al final se agregó un volumen de bloqueador, los geles preparados colocaron en una solución de ácido acético al 1%. Para la toma

fotográfica se utilizó un fotodocumentador Gel Doc™ XR+ y el programa de edición de imágenes Imagin Lab™ versión 4.0.

6.2.4. Evaluación cualitativa de cepas de *Aspergillus* productoras de xilanasas

6.2.4.1. Determinación de halos de hidrólisis

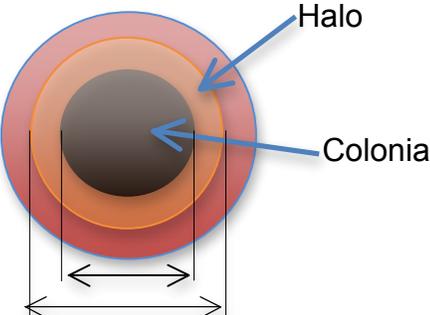
Las cepas de *Aspergillus niger* A732, WT y ATCC se cultivaron en medio de cultivo PDA, para ello se realizó el siguiente procedimiento: se prepararon volúmenes de 25 mililitros de medio PDA en matraces Erlenmeyer de 125 mililitros, se esterilizaron en condiciones de calor húmedo a 120 °C por 15 minutos posterior a este tiempo se esperó a que bajara la temperatura del medio de cultivo de forma que al final se procedió a la inoculación de las cepas mediante una asada de esporas hacia el interior del medio tibio. El matraz se agitó al instante con movimientos orbitales sobre una superficie plana con fin de homogenizar. Posterior a esto se llevó a incubación a una temperatura de 30 °C durante 4 días en condiciones estáticas hasta la generación de micelio esporulado sobre la superficie del medio.

Las esporas se recolectaron de acuerdo al siguiente procedimiento: se preparó en un matraz de 125 ml una solución de Tween 20 al 0.1 % en un volumen final de 25 mililitros, colocando previamente una barra magnética en su interior, y se procedió a esterilizar mediante calor húmedo a 120 °C por 15 minutos. En condiciones estériles fue vertido el contenido de la solución de tween 20 al 0.1 % al cultivo de esporas y enseguida fue colocado sobre un agitador magnético por un tiempo de 2 minutos.

Una vez cosechadas las esporas en 25 mililitros de solución de tween 20 al 0.1 %, se realizó un recuento de esporas en cámara de Newbauer con fin de contabilizar la cantidad de esporas en la solución. Se realizó el cálculo por el método matemático de la regla de tres y se inoculó la cantidad de 1×10^4 esporas

en un medio de cultivo salino ISP-3 suplementado con 1 % de xilano de madera de haya en cajas Petri de 90 x 15 mm mediante el método de pozo en placa. Se incubó a una temperatura de 30 °C durante cuatro días en posición invertida. En una segunda etapa se procedió a tñó el medio de cultivo con una solución acuosa de rojo Congo al 0.1 % con un tiempo de contacto de 15 minutos, después se destñó con una solución de cloruro de sodio a una concentración 1 M con un tiempo de contacto de 15 minutos (Teather y Wood, 1982). Al final se tomó la medida del diámetro de la colonia y el diámetro del halo formado (zonas incoloras) y se realizó el cálculo mostrado a continuación:

$$a = \pi \cdot r^2$$

$$\text{Relación de área} = \frac{\text{Área del halo formado}}{\text{Área de la colonia}}$$


El diagrama ilustra un cultivo en placa con una colonia central oscura y un halo más claro que la rodea. Se muestran líneas de medida para determinar el diámetro de la colonia y el diámetro del halo. Las etiquetas 'Halo' y 'Colonia' apuntan a sus respectivas partes.

6.2.5. Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática endo-β-1,4-xilanasas de las cepas de *Aspergillus niger*

Se realizó una curva de calibración empleando al monosacárido de xilosa como estándar y se obtuvo con ello la ecuación de la recta para cálculos posteriores. Se siguieron las instrucciones de acuerdo a las condiciones propuestas por Fang y col., (2008). En un tubo Eppendorf® de dos mililitros se mezclaron 25 microlitros de muestra y 50 microlitros de una solución de xilano de madera de haya al 1 % preparado en amortiguador de ácido cítrico monohidratado a una concentración de 50 mM y tamponada a pH 4.8, posteriormente se incubó la mezcla de reacción a 50 °C por 15 minutos. Al final de la incubación se adicionó 180 microlitros de DNS, se mezcló y se incubó en un baño seco por un tiempo de 15 minutos a una temperatura de 99 °C. Al final se agregaron 1200 microlitros de agua destilada. La mezclas se agitaron por 4 segundos. Se tomó 1 mililitro para su

lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nanómetros (Fang y col., 2008).

6.2.6. Análisis de proteínas con actividad xilanasa y perfil de proteínas extracelulares de *Aspergillus niger*

6.2.6.1 Preparación de geles SDS- PAGE

Se prepararon geles bajo condiciones semi desnaturizantes empleando geles de poliacrilamida al 10 % de acrilamida y bis acrilamida con una relación de 37.5:1 de 1 mm de espesor (Laemmli, 1970). Para esto se empleó una solución comercial de acrilamida y bis acrilamida al 40% preparando los geles de poliacrilamida al 10% de acuerdo al Cuadro 6.2.6.1.1:

Cuadro 6.2.6.1.1. Preparación de geles de poliacrilamida al 10 %

Ingrediente	Gel separador 10%	Gel concentrador 4%
Acrilamida/Bis al 40%	2.5 ml	0.5 ml
Tris HCl pH 8.8	2.5 ml	*
Tris HCl pH 6.8	*	1.25 ml
SDS al 10%	100 µl	50 µl
Agua destilada	4.85 ml	3.2 ml
TEMED	5 µl	5 µl
PSA al 10%	25 µl	25 µl

* No incluye al ingrediente en la mezcla de reacción.

Las muestras de proteína se mezclaron en relación 1:1 (50 microlitros de muestra y 50 microlitros de amortiguador de carga sin β -mercaptoetanol) prosiguiendo a su desnaturización en un baño seco por un tiempo de contacto de ocho minutos a una temperatura de 80 °C.

6.2.4.3.2. Procedimiento de carga de muestras en geles de SDS-PAGE

Al término de esto se cargó el gel en un equipo de electroforesis, vertiendo una solución del amortiguador de corrida con glicina tamponada a pH 8.3, se cargó la cantidad de 190 nanogramos de proteína por pozo en el gel, programando un tiempo de corrida a 80 V / 35 mA por un tiempo de 3.1 horas. Posterior a este procedimiento, los geles fueron teñidos con plata.

6.2.6.2. Determinación de actividad enzimática endo- β -1,4-xilanasas por zimografía

Se prepararon geles de poliacrilamida con SDS al 10% y sin la adición de beta-mercaptoetanol, conteniendo xilano de madera de haya al 0.1%. Las muestras de proteínas se prepararon en relación 1:1 (50 microlitros de muestra: 50 microlitros de buffer de carga sin β -mercaptoetanol), estas muestras fueron calentadas a una temperatura de 80 °C por un tiempo de 8 minutos. La electroforesis fue llevada a cabo a temperatura ambiente a una corriente constante de 80 V y 35 mA por un tiempo de corrida de 3 horas y 10 minutos.

Al término de la electroforesis los geles se lavaron con Triton® X-100 al 1% por 1 hora a 4 °C. Después se lavó con agua destilada a 4 °C para remover el excedente de Triton® X-100 y SDS con tres cambios de agua cada 20 minutos. Finalmente se realizó un lavado a 4 °C con DTT a una concentración 20 nM preparado en solución amortiguadora de citrato a una concentración 50 mM tamponada a pH 4.8. Para hacer visible las bandas de la actividad xilanasas se procedió a teñir los geles con una solución de rojo Congo al 0.1% por 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavó con una solución de NaCl 1 M. Se visualizaron bandas amarillas en el gel de un contraste de color rojo, lo cual indicó la presencia de una enzima xilanólítica activa. Para la toma fotográfica se utilizó un fotodocumentador Gel Doc™ XR+ y el programa de edición de imágenes Imagin Lab™ versión 4.0

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Evaluación cualitativa de cepas de *Aspergillus* productoras de xilanasas

Una forma cualitativa de seleccionar cepas de *Aspergillus niger* productoras xilanasas mediante halos con rojo Congo ha sido reportada (Venkateshy y Tallapragada, 2009). La evaluación de tres cepas de *Aspergillus* demostró la capacidad metabólica de dos cepas para producir enzimas extracelulares y formar zonas incoloras que hacen evidente la degradación de los enlaces β -1,4-glicosídicos del xilano (Teather y Wood, 1982) (Ver anexo, figura A1). Los resultados de las relaciones de área obtenidas por las cepas productoras se muestran en el cuadro Cuadro 7.1.1:

Cuadro 7.1.1 Análisis de los halos de hidrólisis obtenidos de cepas de *Aspergillus*

Cepa	Relación de área de halos
<i>Aspergillus niger</i> WT	^a 1.23 \pm 0.002
<i>Aspergillus niger</i> A732	^a 1.20 \pm 0.009
<i>Aspergillus niger</i> ATCC-16404	^b 0.00 \pm 0.000

Los datos expresan la media \pm el error estándar (n=3)

^{a,b} Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

Las cepas A732 y WT no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la relación de área obtenida, por lo que se seleccionaron para posteriores análisis. La cepa ATCC-16404 se descartó debido a que no formó halos de hidrólisis en el medio.

7.2. Preparación del soporte lignocelulósico para el cultivo sólido

El cultivo en fase sólida (SSF) es un método popular para la producción de xilanasas en hongos filamentosos. Esta forma de cultivo permite el desarrollo

del microorganismo sobre un soporte sólido humedecido, libre de flujo de agua. Se han reportado en la literatura varios materiales lignocelulósicos como sustratos para la producción de xilanasas (Carmona y col., 1998), arabinoxilano de salvado de avena (Bataillon y col., 2000), salvado de trigo (Shahi y col., 2011), arroz integral, bagazo de caña de azúcar (Betini y col., 2009), cascarilla del fruto de palma de aceite (Lakshmi y col., 2011) entre otras. Venkateshy y Tallapagada (2009) propusieron el uso de diferentes materiales lignocelulósicos en cultivos en fase sólida y encontraron que varios de estos materiales permiten obtener altas actividades enzimáticas; por ejemplo el salvado de trigo permite obtener 9.87 U/ml y aserrín (3.75 U/ml). Estos mismos autores concluyen que el salvado de trigo y otros materiales como el salvado de avena, son materiales baratos para la producción de xilanasas, lo que permite disminuir los costos de producción.

El salvado de trigo presentó una disminución en los valores de actividad de agua cuando se redujo el tamaño de partícula (figura 7.2.1.). Se pudo apreciar que el salvado entero presentó un comportamiento constante en la actividad de agua al incrementar la proporción de medio ISP-3. Se seleccionó la relación 1:4 como la relación de 10 gramos de salvado de trigo y 40 mililitros de medio ISP-3 que proporcionaron un soporte humedecido y adecuado para el cultivo sólido. El valor del contenido de humedad relativa bajo estas condiciones fue del 75 %, lo cual concuerda con lo reportado por Suvarna y col. (2011), quienes observaron que la mayor actividad xilanólítica se obtuvo después de incubar cepas de *Aspergillus* con un contenido de humedad relativa del 70 % y al disminuir contenido de humedad alrededor del 65 y 60 % se vió disminuida la producción de xilanasas. El tamaño de partícula de los sustratos usados en el cultivo sólido influye notablemente en el crecimiento microbiano y afecta a dos fenómenos de transporte importantes la transferencia de masa y la transferencia de calor. Se ha reportado para *Trichoderma reesei* que al usar materiales agrícolas reducidos en tamaños de partícula se pueden inducir un incremento de celulasas y xilanasas lo que trae consigo un incremento de la actividad enzimática (Xin y Geng, 2010). Reportes en *Aspergillus terreus* y *Aspergillus fumigatus* mostraron una alta

producción de xilanasas cuando se utilizó fibra de palma con tamaños de partículas mayores (Suvarna y col., 2011).

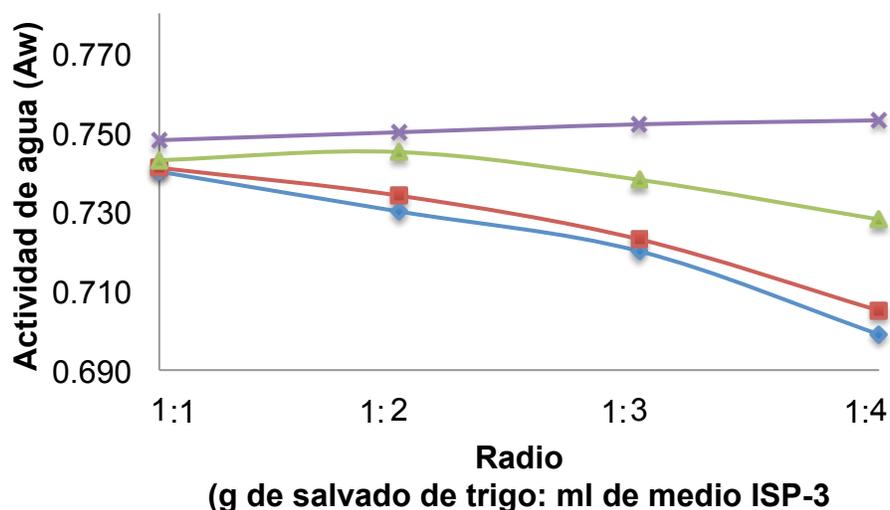


Figura 7.2.1. Influencia de la relación del medio de cultivo ISP-3 con el salvado de trigo con cuatro tamaños de partícula sobre la actividad de agua (× salvado entero <math>< \approx 5\text{ mm}>; Δ salvado grande <math>< 3.36\text{ mm}>; ■ salvado mediano <math>< 2.38\text{ mm}>; ♦ salvado fino <math>< 1.00\text{ mm}>).

El salvado de avena no pudo tamizarse debido a la heterogeneidad obtenida cuando se hizo pasar por cualquiera de las mallas, separando dos porciones diferentes: una en harina de almidón y restos de salvado y otra fracción mayoritaria de salvado entero. Por lo que se decidió utilizarlo entero para los ensayos de actividad de agua. Se observó que los valores de actividad de agua fueron constantes al incrementar la cantidad de líquido (figura 7.2.2). Se decidió utilizar la relación 1:2 como la proporción ideal que permitía empapar el salvado y formar un sistema con características que necesita un cultivo en estado sólido. La humedad relativa obtenida bajo estas condiciones fue del 75 %. No se usó una relación más alta debido a que el salvado presentaba características de una fase líquida.

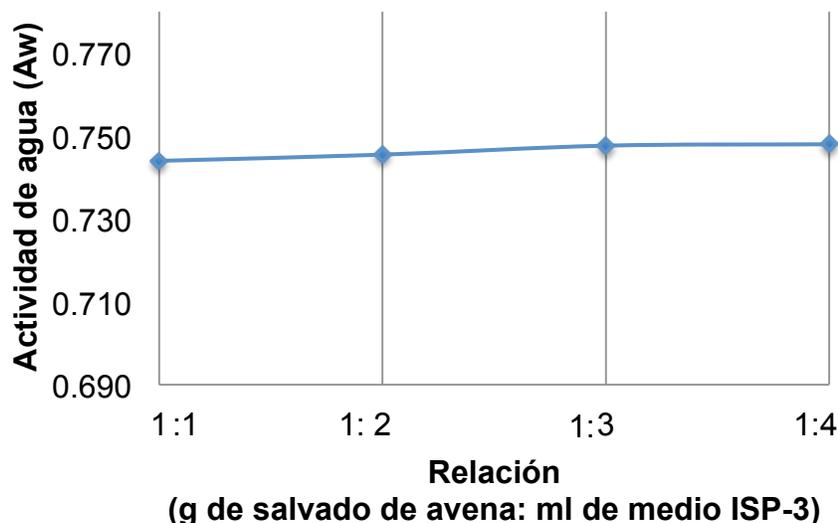


Figura 7.2.2. Influencia de la relación del medio de cultivo ISP-3 y su contenido de salvado de avena sobre la actividad de agua.

7.3 Análisis estadístico de factores que modifican la actividad enzimática xilanolítica.

Se analizaron cuatro factores principales: tipo de cepa, tipo de salvado, pH y temperatura que, de acuerdo con la literatura, afectan la producción de enzimas xilanolíticas. El análisis no mostró efectos de interacción, solo fueron significativos algunos efectos individuales entre los factores. El análisis de los datos en el tercer día mostró que la temperatura ($p=0.0279$) y el tipo de salvado ($p=0.0729$) presentaron diferencias significativas sobre la variable respuesta. Un incremento en la temperatura produjo la disminución de la actividad enzimática. Los cultivos con salvado de avena presentaron una mayor actividad enzimática que con salvado de trigo. En el día cuatro, el factor principal que influyó sobre la actividad xilanasa fue el salvado de avena ($p=0.0458$).

7.4 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática xilanolítica de la cepa de *Aspergillus niger* WT en cultivo sólido de salvado trigo y salvado de avena.

La temperatura y el pH son conocidos como dos factores limitantes que afectan directamente la actividad enzimática de las xilanasas. Se ha reportado que al optimizar estos dos parámetros se mejora la actividad enzimática xilanolítica. La figura 7.3.1. muestra los valores de actividad xilanasa producida por el cultivo sólido sobre salvado de trigo. Se observó que en todos los tratamientos una baja actividad.

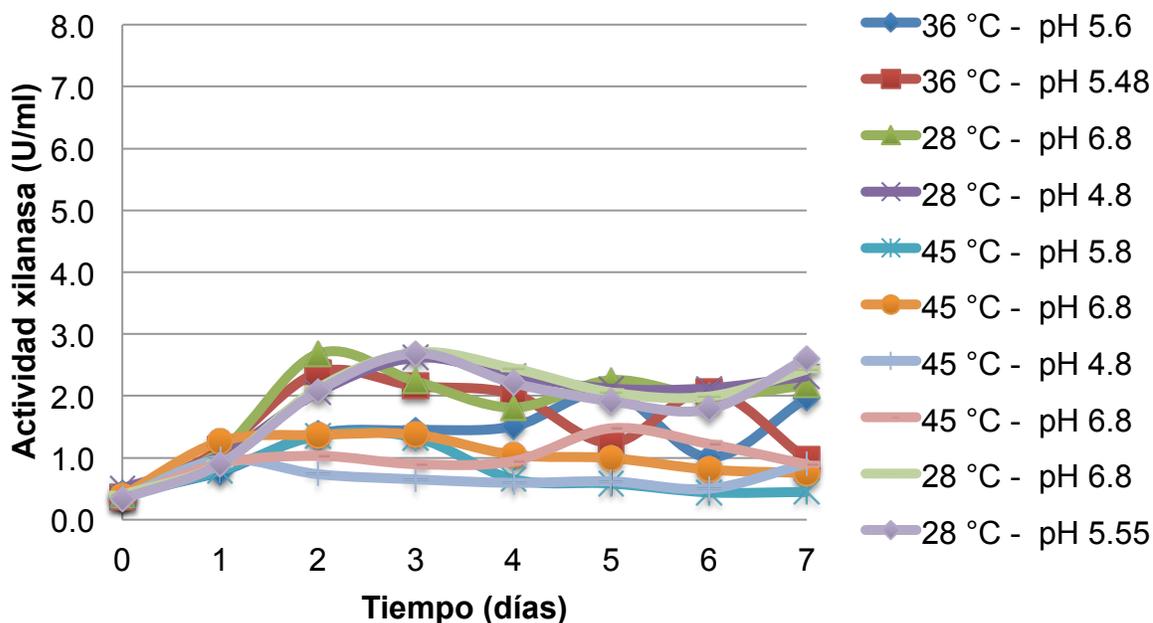


Figura 7.3.1. Actividad xilanasa de *Aspergillus niger* WT en cultivo sólido de salvado de trigo a diferentes tratamientos de pH y temperatura.

En general, se observó que los tratamientos a 45 °C de temperatura mostraron una menor actividad a lo largo del tiempo, en comparación con los cultivos a 36 °C y 28 °C. Todos estos efectos fueron independientes del valor de pH a 28 °C, debido a que como se puede observar en el tratamiento de 28 °C - pH 4.8 este permitió la producción de 2.7 U en el tercer día, cuyo efecto también se alcanzó bajo la condición de 28 °C - pH 6.8 y 28 °C - pH 5.55, por lo que no parece haber un efecto significativo por el pH sobre la actividad enzimática cuando se encuentra en un rango de 4.8 a 6.8 y, por tanto, la actividad enzimática parece estar afectada principalmente por la temperatura.

La cepa WT mostró un mejor comportamiento de actividad en el cultivo con salvado de avena. Se observó una tendencia de disminución de los valores de actividad cuando la temperatura fue de 45 °C, encontrando valores apreciablemente altos cuando la temperatura se encontró en un rango de 28 °C a 36 °C (figura 7.3.2).

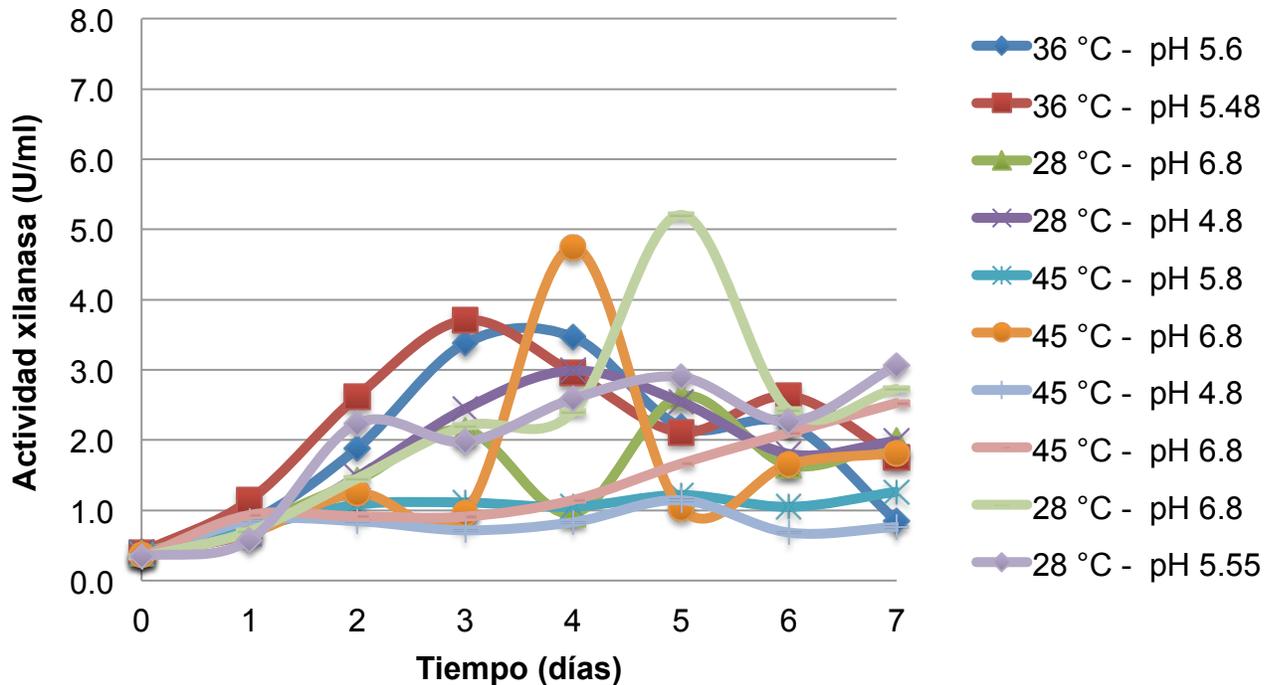


Figura 7.3.2 Actividad xilanasa de *Aspergillus niger* WT en cultivo sólido de salvado de avena a diferentes tratamientos de pH y temperatura

El efecto del pH sobre la actividad enzimática promovió una heterogeneidad de formas y magnitudes de la variable respuesta. En los tratamientos a 36 °C se observó un comportamiento en campana sin repuntes de actividad enzimática. En otros tratamientos se encontró correlación con pH 5.48 y 5.6 lo que permitió alcanzar hasta 3.5 y 3.7 U/ml de actividad xilanasa entre el tercer y cuarto día, respectivamente.

7.5 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática xilanolítica de la cepa de *Aspergillus niger* A732 en cultivo sólido de salvado de trigo y salvado de avena.

Se observó una respuesta pobre de la actividad enzimática cuando se usó el cultivo sólido de trigo. Los tratamientos a 28 °C se presentaron las mayores actividades en 2.7 U/ml en condiciones de pH (4.8, 5.55 y 6.8). Estos resultados demostraron que el efecto del pH no es significativo sobre la actividad. Otros tratamientos a 45 °C mostraron una independencia similar del pH. Por el contrario los niveles de producción más bajos se obtuvieron a temperaturas de 45 °C y 36 °C (figura 7.4.1).

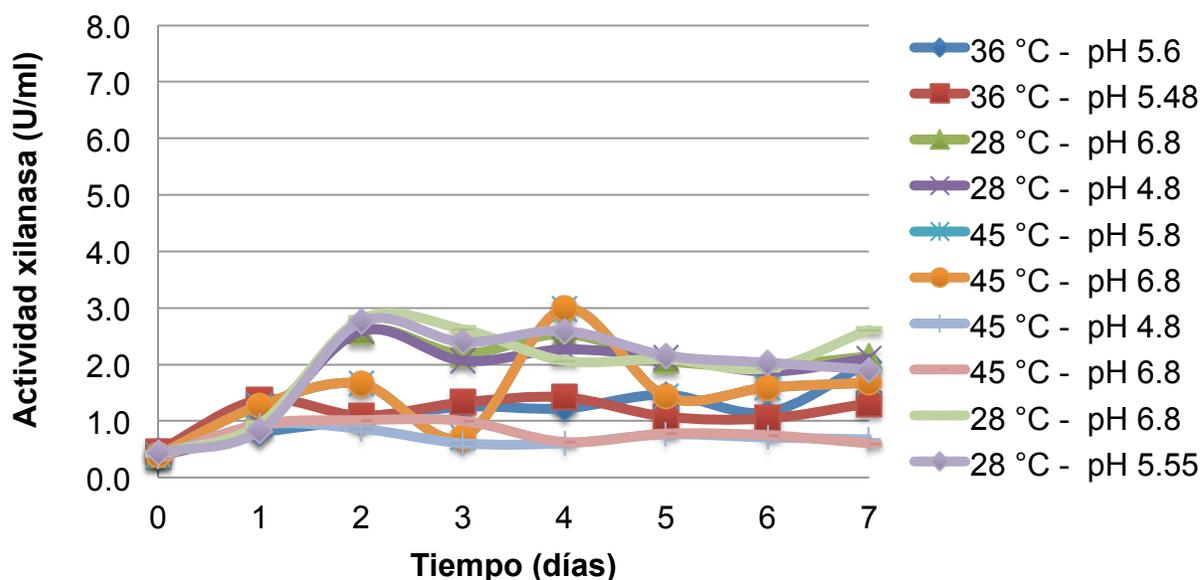


Figura 7.4.1. Actividad xilanasa de *Aspergillus niger* A732 en cultivo sólido de salvado de avena a diferentes tratamientos de pH y temperatura

La cepa A732 demostró una mayor actividad enzimática xilanasa cuando esta se creció en salvado de avena. Como se puede observar hay una variedad de formas y magnitudes sobre la variable respuesta en los diferentes tratamientos experimentales, según se muestra en las curvas de las cinéticas de siete días (figura 7.4.2). En varios de los tratamientos se observaron tendencias crecientes e irregulares de la actividad enzimática. Los tratamientos que produjeron los mejores valores de actividad enzimática fueron las condiciones de 28 °C a pH 5.55 y 6.8. El comportamiento de las curvas y los repuntes de actividad observados en los diferentes tratamientos pueden deberse a dos razones importantes: la primera de

ellas corresponde a necesidades metabólicas de consumo de nutrientes provenientes del salvado de avena, por lo que justifica la necesidad de producción de xilanasas en diferentes etapas fisiológicas del *Aspergillus*, un segundo lugar puede atribuirse a un mezclado inadecuado del material sólido con el hongo filamentoso, crecimiento irregular del hongo en la fase sólida, problemas de transferencia de oxígeno en la regiones más alejadas de la superficie del cultivo sólido y la baja biodisponibilidad de nutrientes. Estos factores afectaron en forma significativa el comportamiento en esta clase de sistema dinámico durante los días de muestreo.

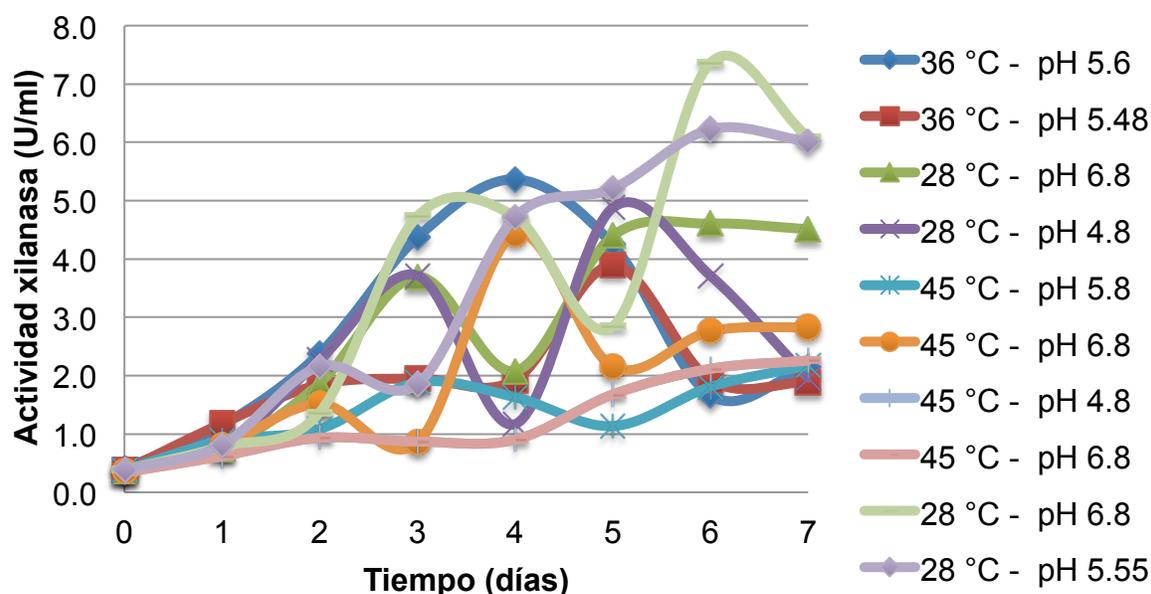


Figura 7.4.2. Actividad xilanasas de *Aspergillus niger* A732 en cultivo sólido de salvado de avena a diferentes tratamientos de pH y temperatura

Umsza y col. (2011) reportaron la influencia del factor del pH sobre la actividad enzimática y encontraron que el pH óptimo de actividad enzimática fue alrededor de pH 5.0. Los autores explican que a este valor se alcanzó la actividad enzimática máxima de un 99 % con pH de 4.5 y 97 % a pH 3.5, por lo que estos autores concluyen que las enzimas xilanolíticas pueden permanecer activas en un amplio rango de pH, manteniendo constante su actividad. Además estos autores mencionan que a valores arriba de pH 10 no fue posible medir actividad enzimática.

Un comportamiento similar se reportó para otros hongos filamentosos como *Aspergillus kawachii* (Ito y col., 1992) y *Penicillium herquei* (Funaguma y col., 1991) que exhibieron un pH óptimo entre 2 y 6 para la actividad xilanasa. En cuanto al factor temperatura Umsza y col., (2011) concluyen que la actividad xilanolítica es estable en un margen de temperatura de 30 a 45 °C y que a temperaturas superiores se presenta la inhibición de la actividad enzimática. Estos mismos autores citan a Beg y col. (2001), quienes reportan que la producción de xilanasas por diferentes especies hongos es estable en un rango de 24 a 60 °C. Ito y col. (1992) reportan que las xilanasas producidas por *Aspergillus kawachii* IFO 438 fueron estables en un rango de temperatura de 30 a 60 °C.

7.6 Análisis de la proteína extracelular sobre la producción global de azúcares reductores

Los condiciones de pH 5.55 - 28 °C (Tratamiento optimizado <a>) y pH 6.8 - 28 °C (Tratamiento optimizado) no mostraron diferencias en el perfil de proteínas solubles y la cantidad de azúcares reductores contenidos en los extractos crudos del SSF de cepa de *Aspergillus niger* A732 (figura 7.5.1). El contenido inicial de proteína (a = 0.11 mg/ml y b = 0.14 mg/ml) disminuyó después de las 24 horas de haberse iniciado el cultivo del hongo, lo que indica que a las 48 horas el hongo ha consumido en su totalidad la proteína del soporte de avena.

Estos resultados corresponden con lo reportado con Asha y col. (2006), quienes mencionan que *Aspergillus niger* S₁₄ en cultivo en fase sólida con salvado de trigo es capaz de metabolizar las proteínas disponibles del sustrato y ,por lo tanto, el perfil de proteínas versus el tiempo es el resultado de dos procesos opuestos: el consumo de proteínas por el sustrato y la producción de proteínas por el hongo.

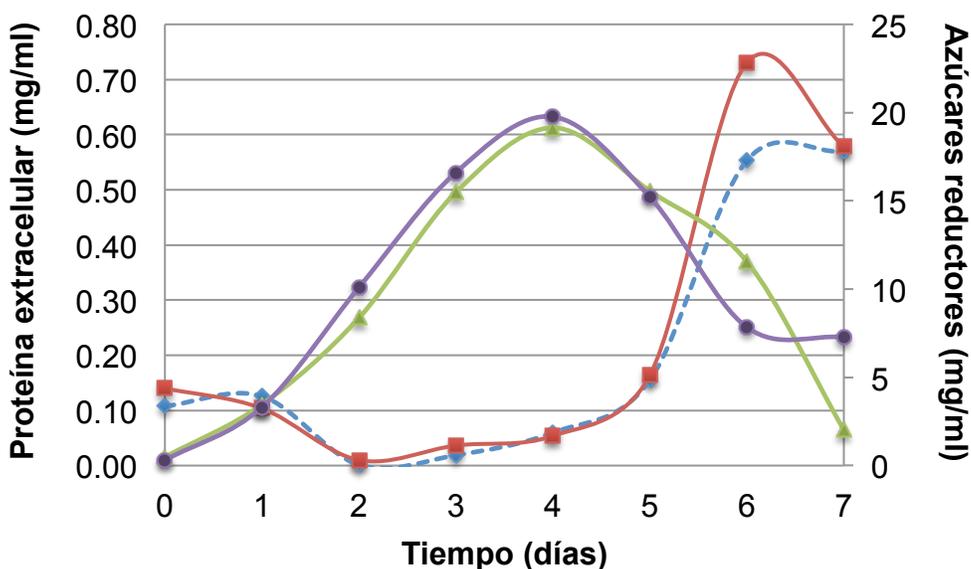


Figura 7.5.1. Evaluación del contenido de proteína y su relación con la producción de azúcares reductores. (pH 6.8 - 28 °C : cuadrado - proteína y círculo - azúcares; pH 5.55 - 28 °C: triángulo - proteína y rombo - azúcares)

Los perfiles de acumulación de azúcares reductores de las condiciones de pH 5.55 - 28 °C (a) y pH 6.8 - 28 °C (b) no mostraron diferencias. El contenido inicial de azúcares reductores (a = 0.48 mg/ml y b = 0.30 mg/ml) mostró un incremento constante de dos unidades después de las 24 horas y hasta el cuarto día donde se presentó el valor máximo de la producción de los azúcares reductores (a = 19.44 mg/ml y b = 19.77 mg/ml).

Se observó una tendencia creciente y paralela del incremento en la producción de proteína soluble y generación de azúcares reductores hasta el día cuatro, lo cual concuerda con las observaciones de Asha y col. (2006) y Kumaran y col. (1997) quienes sugirieron que el aumento en el contenido de proteína en el cultivo en parte se debe a la secreción de enzimas como lacasas, xilanasas, celulasas y otras enzimas extracelulares responsables de la degradación de la biomasa lignocelulósica del cultivo sólido. Y debido a la acción enzimática de

estas lignocelulasas y hemicelulasas se aumenta la producción de azúcares reductores.

Después del cuarto día ($a = 0.16$ mg/ml y $b = 0.06$ mg/ml) fue evidente un incremento sustancial en el contenido de proteína soluble hasta el día seis ($a = 0.55$ mg/ml y $b = 0.054$ mg/ml) y una disminución de la producción de azúcares reductores después de llegar al punto máximo de producción. Estos aumentos en el contenido de la proteína soluble concuerdan con la aparición de esporulación en los últimos días de los cultivos sólidos, debido a la falta de nutrientes disponibles (figura 7.5.1), lo cual trae consigo procesos de autólisis mediada por quitinasas (Pocsi y col., 2009) y quizá fenómenos intrínsecos de muerte celular programada de *Aspergillus niger* (Yamazaki y col., 2007). La autólisis por tanto surge como un factor extrínseco que permite la liberación de contenido extracelular al medio lo cual incrementando el contenido de proteína (Yamazaki y col., 2007).

7.7 Análisis de la actividad enzimática xilanasa sobre el perfil de liberación de los azúcares reductores

El perfil de actividad enzimática de las condiciones de pH 5.55 - 28 °C (a) y pH 6.8 - 28 °C (b) no mostraron diferencias. Se observó un mínimo de actividad a las 24 horas ($a = 1.6$ U/ml y $b = 1.7$ U/ml) y máximo de actividad xilanasa entre el día tres ($a = 5.5$ U/ml y $b = 5.6$ U/ml) y cuatro ($a = 5.38$ U/ml y $b = 5.5$ U/ml) lo que coincide con un máximo de la producción de los azúcares reductores en el día tres (figura 7.6.1).

Por lo que la acción de las xilanasa sobre el salvado de avena permite liberar azúcares reductores tal como, D - xilosa en concentraciones mayores y aportar al global de los azúcares reductores producidos. Por tanto, los valores obtenidos por *Aspergillus niger* A732 concuerdan con los hallazgos de Venkatesh y Tallapragada en el 2009 quienes reportan valores de actividad para *Aspergillus niger* de 6.11 U/ml en un mayor tiempo (6 días) bajo condiciones de cultivo sólido

en salvado de trigo. La actividad específica para los días tres ($a= 291$ U/mg de proteína y $b= 90$ U/ mg de proteína) y cuatro ($a= 153$ U/mg de proteína y $b= 101$ U/ mg de proteína) muestra altas actividades, lo cual concuerda con lo reportado en otras especies de *Aspergillus niger* con actividad volumétrica de 22.5 U/ml y alta actividad específica de 636 U/mg de proteína (Carmona y col., 1998). Esto se puede atribuir a la dependencia de la especificidad de la enzima con su sustrato, lo que permite una mayor afinidad y por tanto una mejor inducción de xilanasas por el microorganismo.

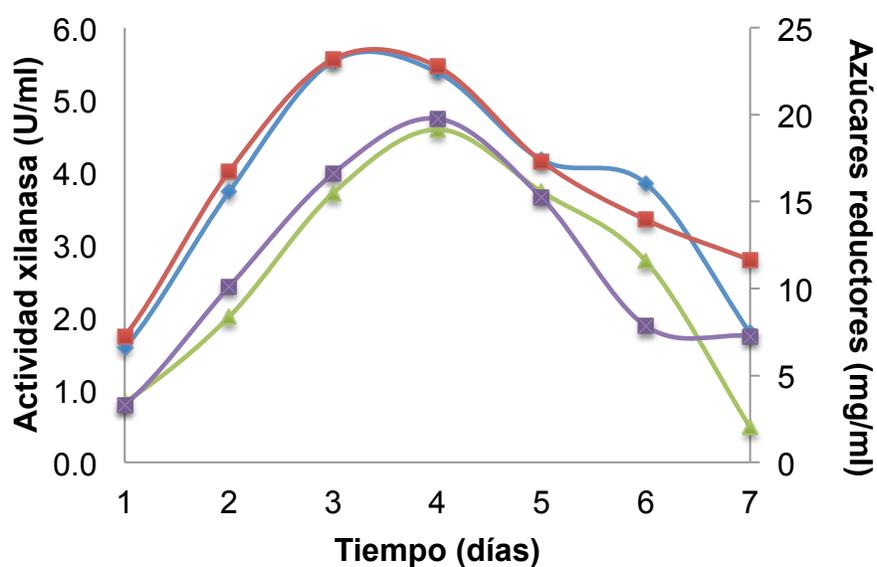


Figura 7.6.1. Evaluación de la actividad xilanasas y su relación con la producción de azúcares reductores. (pH 6.8 - 28 °C: cuadrado - proteína y círculo - azúcares; pH 5.55 - 28 °C: triángulo - proteína y rombo - azúcares) .

Los valores de actividad enzimática llegan al valor máximo entre el tercer y cuarto día, tras lo cual se observa un claro descenso en la respuesta. Esto debido posiblemente a la acumulación de desechos y el agotamiento de los nutrientes en el medio, lo que conduce tanto a una disminución en el crecimiento como de la producción de enzimas como las xilanasas (Venkatesh y Tallapragada, 2009).

7.8. Análisis del perfil de producción de xilanasas bajo condiciones óptimas

La muestra de proteínas contenidas en el extracto crudo de la condición pH 6.8 - 28 °C se separaron por electroforesis de SDS-PAGE. Los extractos del cultivo sólido con salvado de avena obtuvieron ocho bandas de proteínas en un rango de 20 a 85 kDa en un gel teñido con plata y la zimografía mostró la presencia de dos zonas con halos de hidrólisis que corresponden a las bandas en el gel con plata con un peso aproximado de 20 y 25 kDa. Para el salvado de trigo se observó un perfil de bandeado en un rango de 15 a 100 kDa y la zimografía mostró 2 bandas activas de 20 y 25 kDa.

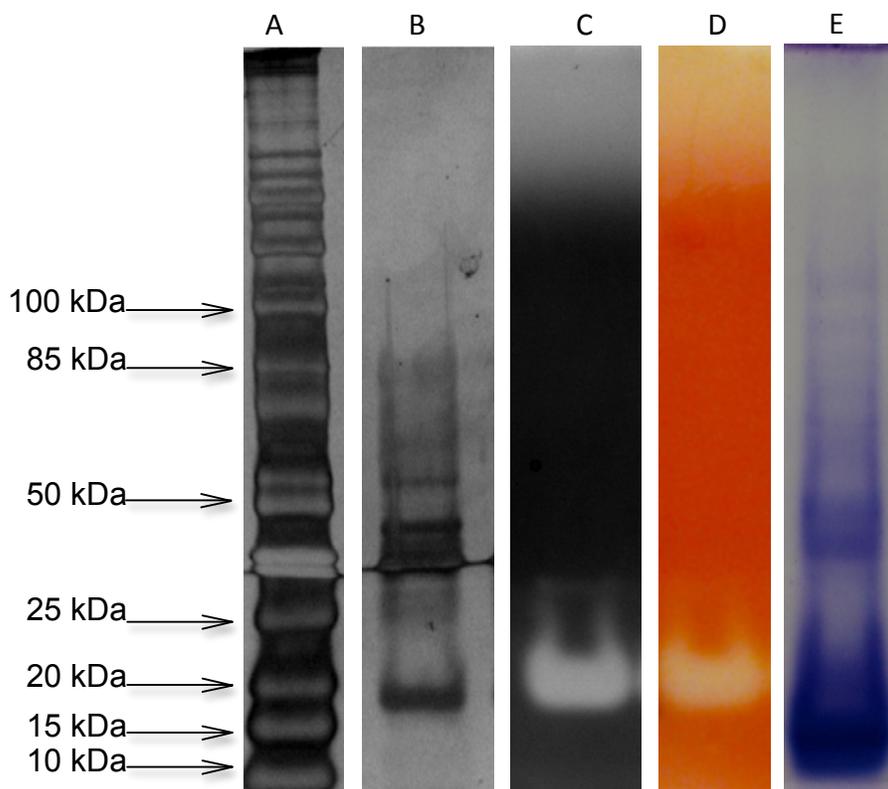


Figura 7.7.1. Geles de poliacrilamida del cultivo de *Aspergillus niger* A732 en fase sólida: 1) Salvado de avena: (a) marcador (b) SDS-PAGE con tinción de plata (c) zimograma. 2) Salvado de avena: (d) zimograma (e) SDS-PAGE con azul de Coomassie.

Estas xilanasas corresponden a los pesos moleculares de xilanasas reportadas en *Aspergillus carneus* M34 (18.8 kDa) (Hsin y col., 2008), *Aspergillus terreus* NRRL 1960 (19 kDa) (Aytac y col., 2011), *Aspergillus niger* (20.8 kDa) (Frederick y col., 1981) y *Aspergillus awamori* (23 y 26 kDa) (Kormelink y col., 1993), *Aspergillus fumigatus* (19 kDa) (Silva y col., 1999), *Aspergillus caespitosus* (26.3 y 27 kDa) (Sandrim y col., 2005) y otros organismos como *Penicillium* sp ATH-1 (21 kDa) (Rahaman y col., 2003). Aunque pueden encontrarse otras enzimas xilanolíticas en *Aspergillus awamori* (32.87 kDa) (Teixeira y col., 2010) y *Aspergillus terreus* (67 kDa) (Pal y col., 2006), que corresponden a enzimas de mayor tamaño.

Las xilanasas de bajo peso molecular pueden traer importantes beneficios en la industria de la panificación debido a que podrían difundir mejor dentro de la estructura de la biomasa, entre los arabinoxilanos ramificados y producir una hidrólisis más eficiente de los xilanos presentes (Teixeira y col., 2010). El volumen de la hogaza es un criterio básico de calidad en el pan debido a que un producto de volumen insuficiente y de miga dura, no solo es indeseable sino que además es difícil de digerir. Una forma de evitar estos problemas es mediante el uso de xilanasas que modifican los arabinoxilanos en las harinas del trigo, lo que incrementa el volumen final hasta en un 10 % de acuerdo con Romanowska y col. (2006). Además, estos autores reportaron los efectos del uso de una xilanasas purificada de *Aspergillus niger* IBT-90 (60 kDa) en masas a base de harinas de trigo y centeno, observándose un efecto de la suplementación de la masa con xilanasas sobre el volumen específico del pan, porosidad de la miga y en la humedad del producto.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Las cepas de *Aspergillus niger* A732 y *Aspergillus niger* WT mostraron la capacidad de secreción de enzimas xilanolíticas al medio de cultivo en agar.
- 2.- Las cepas A732 y WT provenientes del cultivo sólido de salvado de avena presentaron actividad xilanasa sobre xilano de madera de haya como sustrato modelo.
- 3.- Se logró optimizar la producción de xilanasas de la cepa A732 en un cultivo sólido con salvado de avena a 28°C y pH comprendidos entre 5.55 y 6.8.
- 4.-El perfil de azúcares reductores producidos por la cepa A732 presentó su máximo nivel de productividad en el mismo día de la mayor actividad xilanasa lo cual, permite una contribución de azúcares reductores liberados del xilano presente en el salvado de avena al total de los azúcares producidos.
- 5.- Se logró la identificación cualitativa de dos enzimas xilanolíticas activas con un peso aproximado de 20 y 25 kDa, respectivamente.
6. Se demostró que *Aspergillus niger* es capaz de producir xilanasas a partir de un soporte sólido de salvado de avena y, en forma escasa, en el salvado de trigo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aro N., Pakula T., Penttila M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 29, 719–739.

Asha A., Imelda J., Raj R.P. 2006. Biomass estimation of *Aspergillus niger* S₁₄ a mangrove fungal isolate and *A. oryzae* NCIM 1212 in solid-state fermentation. *J Mar Biol Ass Indian.* 48, 139 – 146.

Aytac K., Didem S.K., Ufuk B.B. 1960. One – step purification and characterization of a low molecular weight xylanase from *Aspergillus terreus* NRRL. *JABS.* 5, 61 – 65.

Badal C.S., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30, 279-291.

Bachmann S.L., McCarthy A.J. 1991. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. *Appl Environ Microbiol.* 57, 2121–2130.

Bataillon M., Cardinali A.P.N., Castillon N., Du C.F., 2000. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus sp.* strain SPS-0. *Enzyme Microbiol Technol.* 26, 187 - 192.

Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microb Biotechnol.* 56, 326-338.

Betini J.H.A., Michelin M., Peixoto S.C., Terenzi H.F., Polizeli M. 2009. Xilanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32, 819-824.

Brink J., Vries R., 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 1477 - 1492.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Butt M.S., Tahir M., Ahmad Z., Tauseef M. 2008. Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technol Biotechnol* 46, 22 - 31.

Curtin C.W., Delcour J.A., 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread making. *J Cereal Sci.* 35, 225-243.

Carmona E.C., Brochetto B.M.R., Pizzirani K.A.A., Joao A.J. 1998. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. *FEMS Microbiol Let.* 166, 311 – 315.

Cosgrove D. 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13, 171 – 201.

Davies G., Hennissat B. 1995. Structures and mechanism of glucosyl hydrolases. *Structure* 3, 853 – 859.

Dervilly G., Thibault J.F., Saulnier L. 2001. Experimental evidence for a semi flexible conformation for arabinoxylans. *Carbohydr Res.* 330, 365 - 372.

Ebringerova A., Hromadkova Z., Heinze T. 2005. Hemicellulose. *Adv Polym Sci.* 186,1 – 67.

Fang H.Y., Chang S.M., Lan C.H., Fang T.J. 2008. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry*. 43, 49 - 55.

Frederick M.M., Frederick J.R., Fratzke A.R., Reilly P.J. 1981. Purification and characterization of a xylanase – and xylose – producing endo – xylanase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr Res*. 97, 87 – 103.

Funaguma T., Naito S., Morita M., Okumara M., Sugiura M., Hara, A. 1991. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Banier and Sartory. *Agric Biol Chem*. 55, 1163 - 1165.

Gang G., Zhenghechu L., Junfei X., Jiangping L., Xiaoyang D., Daping X., Keqing P., Xiangyuan F., Shengwen D., Ke Z., Lifeng C., Yueguan F. 2012. Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line. *J Basic Microbiol*. 54, 419 – 428.

Gupta V.K., Gaur R., Yadava S.K., Darmwal N.S. 2009. Optimization of xylanase production from free and immobilized cells of *Fosarium Solani* F7. *Bio Resources*. 4, 932 - 945.

Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe K., Steiner W., Zupanic S. 1996. Production of fungal xylanases. *Bioresour Technol*. 58, 137 – 161.

Ito K., Ogassawara J., Sugimoto T., Ishikawa T. 1992. Purification and properties of acid stable xylanases form *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 56, 547 - 550.

Jun X., Huang H., Kui Z., Qu L., Xu Q., Tsao G.T., 2012. Fuels and chemicals from hemicellulose sugars. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*. 128, 199 - 224.

Kormelink F.J.M., Van Leenwen S.V., Wood T.M., Voragen A.G.J. 1993. Purification and characterization of three endo - (1,4) - β - xylanases and one β - xylosidase from *Aspergillus awamori*. 27, 249 – 265.

Krisnaveni M., Kowsalya R. 2011. Production and optimization of xylanase from estuarine *Bacillus cereus*. Int J Pharm Bio Sci. 40, B505 – B510.

Kumaran S., Sastry C.A., Vikineswary S. 1997. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. World J Microb Biot. 13, 43- 49.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227, 680 - 685.

McCleary B.V. 1986. Enzymatic modification of plant polysaccharides. Int J Biol Macrobiol. 8,349 - 354.

Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chem. 31, 426.

Pal A., Ray L., Chattopadhyay P. 2006. Purification and immobilization of an *Aspergillus terreus* xylanase: use of continuous fluidized bed column reactor. Indian J Biotechnol. 5, 163- 168.

Peixoto S.C., Michelin M., Almeida J.H., Joao J., Terenzi H.F., Teixeira M.L. 2009. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. J Ind Microbiol Biotechnol. 36, 149 - 155.

Pocsi I., Leiter E., Know N.J., Shin K.S., Kwon G.S., Pusztahelyi T., Emri T., Abuknesha R.A., Price R.G., Yu J.H. 2009. Asexual sporulation signalling

regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. J Appl Microbiol. 107, 514 – 523.

Rahman A.K.M., Sugitani N., Hatsu M., Takamizawa K. 2003. A role of xylanase, alfa-L-arabinofuranosidase, and xilosidase in xylan degradation. Can J Microbiol. 49, 58 – 64.

Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. EJB. 1, 1 - 15

Rodríguez S., Sanromán M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. J Food Eng. 76, 291 - 302.

Rouau X., Mayek M.L., Moreau D.M. 1994. Effect of enzyme preparation containing pentosanases on bread making quality of flours to changes in pentosans properties. J Cereal Sci. 19, 259 – 272.

Romanowska I., Polak J., Bielecki S., 2006. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. Appl Microbiol Biotechnol 69, 665 -671.

Ronald M. 2006. Handbook of microbiological media for the examination of food. (2th Ed.) Taylor and Francis (Ed.) CRC, New York.

Saha B. 2003. hemicellulose converssion. J Ind Microbiol Biotechnol. 30, 279 – 291.

Shahi S.S., Alemzadeh I., Khanahmadi M., Roostaazad R. 2011. Xylanase production under solid state fermentation by *Aspergillus niger*. IJE transactions B: applications. 24, 197 – 208.

Sandrim V.C., Rizzatti A.C.S., Terenzi H.F., Jorge J.A., Milagres A.M.F., Polizeli M.L.T.M. 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases

produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. Process Biochem. 40, 1823 – 1828.

Silva C.H., Puls J., Sousa M.V., Filho E.X.F. 1999. Purification and characterization of low-molecular-weight xylanase from solid - state cultures of *Aspergillus fumigatus* fresenius. Rev Microbiol. 30,114 – 119.

Suraini A.A., Gan S.H., Mohd A.H., Abdul K. Noraini S. 2008. Indirect method for quantification of cell biomass during solid – state fermentation of palm kernel cake based on protein content. Asian J Sci Res. 1, 385 – 393.

Suvarna L., Lakshmi B. Prakashma RS. 2011. Sustainable bioprocess evaluation for xylanase production by isolated *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* under solide – state fermentarion using oil palm empty fruit bunch fiber. Curr Trends Biotechnol Pharm. 5, 1434 – 1444.

Teather R.M., Wood P.J. 1982. Use of Congo red – polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microbiol. 43, 777 – 780.

Teixeira R.S.S., Siqueira F.G., Souza M.V. Filho E.X.F., Bon E.P.S. 2010. Purification and characterization studies of a thermostable β - xylanase from *Aspergillus awamori*. J. Ind Microbiol Biotechnol. 37, 1041 – 1051.

Umsza M.A., Días A., Ory I., Blandino A., Gomes E., Caro I. 2011. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. Braz J Microbiol. 42, 1585 – 1597.

Wyman C.E., Decker S.R., Himmel M.E., Brady J.W., Skopec C.E., Viikari L. 2005. Hydrólisis de cellulose y hemicellulose. Chapter 43. Dumitriu S. Polysaccharides strcutural diversity and funtional versatility, Second edition. CRC Press.

Venkatesh K., Tallapragada P. 2009. Optimization of Growth Conditions for Xylanase Production by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. Pol J Microbiol. 2, 125 – 130.

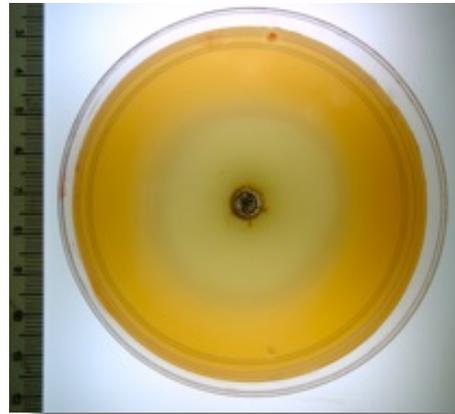
Vries R.P., Battaglia E., Coutinho P.M., Henrissat B., Visser J. 2010. Hemicellulose degrading enzymes and their encoding genes from *Aspergillus* y *Trichoderma*. The Mycota. 14, 341- 350.

Xiao J., He H., Zhi K., Liang Q., Qing X., George T. 2012. Fuels and chemicals from hemicellulose sugars. Adv Biochem Engin/Biotechnol. 128, 199 - 224.

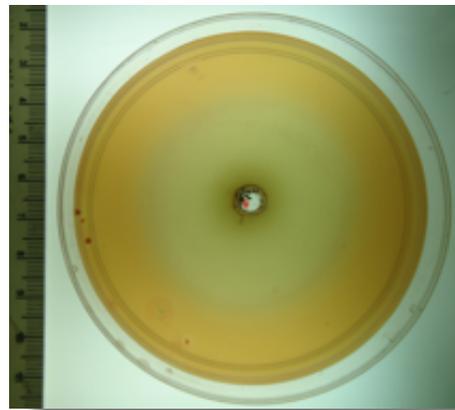
Xin F., Geng A. 2010. Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. Appl Biochem Biotechnol. 162, 295 - 306.

Yamazaki H., Yamazaki D., Takaya N., Takagi M., Ohta A., Horiuchi H. 2007. A chitinase gene, chiB, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. Curr Genet. 57, 89 – 98.

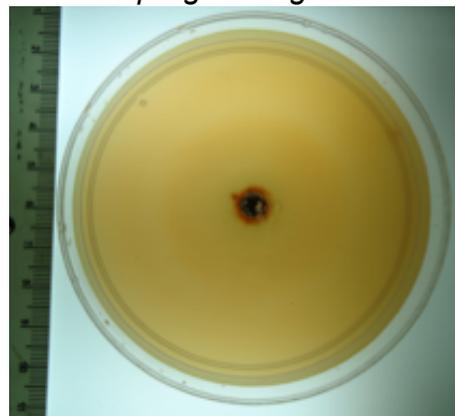
ANEXO A



Aspergillus niger A732



Aspergillus niger WT



Aspergillus niger
ATCC 16404

Figura A.1. Halos de hidrólisis de *Aspergillus niger* A732, y WT en medio sólido ISP-3 suplementado con xilano al 1%. ATCC 16404 no formó halo.